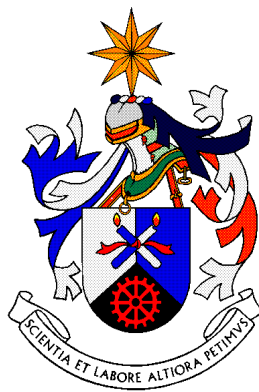


*EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO  
NA PROTEÍNA TAU:  
IMPLICAÇÃO NA DOENÇA DE ALZHEIMER*

Sara Isabel dos Santos Pinheiro

Dissertação de Mestrado em Bioquímica



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Departamento de Química

**Junho de 2010**



**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**



Sara Isabel dos Santos Pinheiro

***EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO  
NA PROTEÍNA TAU:  
IMPLICAÇÃO NA DOENÇA DE ALZHEIMER***

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Bioquímica  
da Universidade da Beira Interior

Sob orientação científica de  
Dr.<sup>a</sup> Maria Jesús Lorenzo Benayas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de  
Extremadura, Cáceres

Sob co-orientação científica de  
Dr. José Francisco da Silva Cascalheira  
Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã

**Junho de 2010**

*“Quando recebermos um ensinamento  
devemos recebê-lo como um valioso  
presente e não como uma dura tarefa.  
Eis aqui que a diferença transcende.”*

**Albert Einstein**

*Aos meus pais, Manuel Pinheiro e  
Fernanda dos Santos, por toda a  
minha vida e oportunidades que nela  
me ofereceram.*

## AGRADECIMENTOS

Porque ao longo da vida o nosso caminho se cruza com o de várias pessoas que nos ajudam a crescer quer como pessoa quer como profissionais, agradeço:

Aos meus pais, Manuel e Fernanda, e ao meu maninho Ivan por todo o carinho, amor, confiança e apoio incondicional que sempre me deram e por me ensinarem que sempre se pode chegar onde queremos. Aos meus avós, tios e tias, primos e primas que muito contribuíram para me tornar a pessoa que hoje sou.

À minha orientadora Dr.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Jesús Lorenzo Benayas pelos ensinamentos que me proporcionou pois realmente foram para mim um grande presente, pelo acolhimento que me ofereceu no seu grupo de investigação e acima de tudo por todo o apoio e confiança que em mim depositou nesta etapa.

Ao meu co-orientador Dr. José Francisco Cascalheira pela honra concedida ao aceitar orientar-me neste trabalho e pelos ensinamentos anteriores que muito contribuíram para o meu gosto pelas neurociências.

A todo o “*Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas*”: Chus, Juan Carlos, Maribel, Marta, Montaña, Paco e Ricardo com quem aprendi muito sobre a palavra “grupo”. A todos agradeço o bom humor, a boa disposição e toda a ajuda preciosa no laboratório quando o tempo escasseava. Martita e Monty agradeço-vos a amizade que me ofereceram desde o primeiro dia que cheguei a Cáceres, as dicas que me ensinaram no trabalho e todos os bons momentos passados, principalmente as boas gargalhadas da “hora da parvoíce”, que de igual modo agradeço à nossa Patri.

Ao Dr. Alberto Alvarez pela ajuda preciosa com os resultados de imunofluorescência e toda a paciência para obtê-los.

Aos meus “*compañeros de piso*”: Alicia, Carol, Gonzalo e Lloana que com o passar do tempo passaram a ser muito mais que isso, mostrando ser verdadeiros amigos. A eles agradeço todos os bons momentos proporcionados, as coisas novas que aprendi, a credibilidade e apoio, e por terem sido a minha família neste ano que passei longe do meu cantinho.

Aos amigos de quase toda uma vida: Fábio, Hugo, Marta, Sandra, Serge, Sofia, Telmo, Tiago e Vitor pois são a prova de que a amizade sempre permanece por mais longe que estejamos.

Àqueles que me acompanharam ao longo dos anos que passei na bela Cidade Neve: Alexandre, Andréa, Cleide, Estela, Eunice, Gerardo, Paulo, Sónia e Tiago pelos momentos inesquecíveis da vida de estudante que passamos juntos, esperando que as paredes da Covilhã nunca nos denunciem.

Também a todos que comigo se cruzaram na caminhada a que chamamos vida, quer como professores, companheiros de casa, escola, trabalho ou de um simples café.

A todos o meu sincero OBRIGADA!

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurológica progressiva associada ao envelhecimento. Clinicamente, é caracterizada por um comprometimento da memória resultando em demência severa, podendo levar à morte dos indivíduos afectados. Como características patológicas, destacam-se a presença de numerosos emaranhados neurofibrilares (NFTs) e de placas senis (SPs) que são depósitos extracelulares de proteína  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A). Os NFTs são redes de filamentos compactos compostos essencialmente por proteína tau hiperfosforilada. A proteína tau é uma proteína associada a microtúbulos (MAP), participando na sua associação e estabilização, e ligando estes polímeros aos filamentos do citoesqueleto contribuindo deste modo para a manutenção da morfologia neuronal e para a formação dos prolongamentos axonais e dendríticos. Estas funções são reguladas pelo seu nível de fosforilação. A DA tem a sua origem numa combinação de vários factores, incluindo a idade, genética, factores ambientais e características de risco. Tem-se referido o óxido nítrico (NO) como estando relacionado com muitos dos mecanismos patológicos da DA. De facto, têm-se observado danos neuronais mediados quer por NO quer por peroxinitritos, e existem indícios de que o NO pode estar envolvido na origem do  $\beta$ A e dos NFTs. Assim, neste trabalho colocou-se a hipótese de que o NO pode influenciar de algum modo a proteína tau, e assim comprometer a comunicação neuronal. Para avaliar esta hipótese usaram-se neuroblastomas humanos submetendo-os a alguns doadores de NO e analisando o efeito destes por *Western blot* e por imunofluorescência. Nos resultados de *Western blot* detectou-se um aumento de tau dependente da concentração do doador de NO, não relacionado com a sua expressão, concluindo-se então que pode relacionar-se com a inibição da sua degradação. Nos resultados de imunofluorescência foi observado que a proteína tau e os neurofilamentos se acumulam no citoplasma. Além disso, observou-se uma perda de dendrites e axónios quando aplicada a concentração de doadores de NO que produz um maior nível de tau. Porém, não se pode afirmar que estes resultados são a consequência do aumento do nível de tau, do efeito do NO ou de ambos. Deste modo, serão necessários mais estudos para entender melhor os efeitos do NO e peroxinitritos na proteína tau.



## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurologic disorder associated with ageing. Clinically, it is characterized by memory impairment resulting in severe dementia and eventually leading to death of affected patients. As pathologic features, it stands out the presence of numerous neurofibrillary tangles (NFTs) and senile plaques (SPs) that are extracellular deposits of beta-amyloid protein (A $\beta$ ). NFTs are a compact filamentous network mainly composed of hyperphosphorylated tau protein. Tau protein is a microtubule-associated protein (MAP), playing a major role in their assembly and stabilization, and in bridging these polymers with other cytoskeletal filaments, thus contributing to maintenance of neuronal morphology and the formation of axonal and dendritic processes. These functions of tau are regulated by its degree of phosphorylation. AD is originated by combination of numerous factors, including age, genetics, environmental factors and other risk characteristics. Nitric oxide (NO) has been referred as a factor related to many of the AD pathological mechanisms. In fact, it have been observed both NO and peroxynitrite-mediated neuronal damage and there are evidences showing that NO may have a role in the development of A $\beta$  and NFT. Thus, in the present work it has been hypothesized that tau protein could be influenced by NO and so compromising neuronal communication. To evaluate this hypothesis human neuroblastoma cells were used and submitted to a treatment with some NO donors, analyzing its effect by Western blot and immunofluorescence. In Western blot results, it was detected a concentration-dependent increase of tau levels, unrelated with their expression, so concluding that it can be related with an inhibition of its degradation. The immunofluorescence results show an accumulation of tau and neurofilaments in the cytoplasm. Moreover, it was also observed dendrits and axons loss when cells were treated with the concentration of NO donors that induces the higher increase of tau. However, it cannot be concluded that these results are an outcome of tau increase, NO effect or both. In this way, further research will be needed to best understand the effects of NO and peroxynitrites in tau protein.

# ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>Índice</b> .....	v
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tabelas</b> .....	xi
<b>I - Introdução</b> .....	1
1. A doença de Alzheimer .....	2
1.1. Epidemiologia e etiologia .....	2
1.1.1. Hipótese da cascata amilóide .....	4
1.1.2. Hipótese metabólica/transdução de sinal .....	5
1.2. Caracterização molecular .....	6
1.3. Diagnóstico e tratamento .....	8
2. A proteína tau .....	9
2.1. Genética .....	10
2.2. Fosforilação da Tau e Implicações Patológicas .....	12
2.3. Ubiquitinação da tau .....	14
3. Óxido Nítrico .....	14
3.1. Importância do NO .....	15
3.2. Óxido nítrico no sistema nervoso .....	16
3.2.1. Óxido nítrico e a doença de Alzheimer .....	18
<b>II - Objectivos</b> .....	23
<b>III - Materiais e métodos</b> .....	24
1. Material .....	25
2. Instrumentação .....	25
3. Reagentes .....	26
4. Procedimento .....	29
4.1. Cultura da linha celular SH-SY5Y e tratamentos .....	29
4.2. Medida da produção de óxido nítrico .....	29
4.3. Western blot .....	30
4.3.1. Preparação dos extractos celulares .....	30

---

4.3.2. Doseamento de proteínas .....	31
4.3.3. Electroforese SDS-PAGE .....	31
4.3.4. Transferência em semi-seco .....	31
4.3.5. Imunodeteção de proteínas .....	32
4.4. Determinação da viabilidade celular .....	33
4.5. Northern Blotting .....	33
4.5.1. Extração do RNA pelo método de Chomczynski.....	34
4.5.2. Separação do RNA, transferência e fixação deste desnaturizado às membranas .....	34
4.5.3. Hibridação em <i>Northern</i> e revelação imunológica .....	35
4.6. Microscopia de imunofluorescência .....	36
4.7. Análise estatística.....	37
<b>IV - Resultados.....</b>	<b>38</b>
1. Quantificação do NO libertado .....	39
2. Efeito dos doadores de NO na proteína tau .....	40
3. Efeito dos doadores de NO na viabilidade das células SH-SY5Y .....	43
4. Análise do mRNA da proteína tau por <i>Northern blot</i> .....	45
5. Estudo do aumento do nível de proteína tau .....	46
6. Estudo da localização de proteínas de transporte neuronal por imunofluorescência... .....	49
<b>V - Discussão e conclusões.....</b>	<b>53</b>
<b>VI - Bibliografia .....</b>	<b>62</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>Act D</b>	Actinomicina D
<b>APS</b>	Persulfato de amónio ( <i>ammonium persulphate</i> )
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>cdk5</b>	Cinase 5 dependente de ciclinas ( <i>cyclin-dependent kinase 5</i> )
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DEANO</b>	<i>Diethylamine NONOate</i>
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DETA/NO</b>	<i>Diethylenetriamine NONOate</i>
<b>DMEM/F12</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
<b>DMSO</b>	Sulfóxido de dimetilo ( <i>dimethyl sulphoxide</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>dUTP</b>	Desoxiuridina trifosfato ( <i>deoxyuridine triphosphate</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino-tetracético ( <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>EGTA</b>	Ácido etileno glicol-tetracético ( <i>ethylen glycol tetraacetic acid</i> )
<b>eNOS</b>	Sintetase do óxido nítrico endotelial
<b>ERK1/2</b>	Cinases reguladas por sinais extracelulares ( <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> )
<b>FA/FA</b>	Formaldeído/Formamida
<b>FAD</b>	Doença de Alzheimer Familiar ( <i>familial Alzheimer's disease</i> )
<b>FTDP-17</b>	Demência fronto-temporal com Parkinsonismo ligado ao cromossoma 17
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Cinase-3 $\beta$ da sintetase do glicogénio ( <i>Glycogen Synthase Kinase 3<math>\beta</math></i> )
<b>Hsp</b>	Proteínas de choque térmico ( <i>Heat shock proteins</i> )
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>iNOS</b>	Sintetase do óxido nítrico indutível
<b>JNK</b>	Cinase do N-terminal c-Jun ( <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> )
<b>LCR</b>	Líquido céfalo-raquidiano
<b>MAC</b>	Complexo de ataque à membrana ( <i>membrane attack complex</i> )

<b>MAP</b>	Proteína associada a microtúbulos ( <i>microtubule-associated protein</i> )
<b>MAPK</b>	Cinase de proteínas activadas por mitogénio ( <i>MAP kinase</i> )
<b>MOPS</b>	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
<b>MPP</b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro ( <i>messenger Ribonucleic Acid</i> )
<b>mtDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>MTOC</b>	Centro organizador de microtúbulos ( <i>microtubule organizing center</i> )
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotnamida e adenina, forma reduzida
<b>NED</b>	Dihidrocloreto de N-1-naftiletilendiamina ( <i>N-1-naphthylenediamine dihydrochloride</i> )
<b>NFT</b>	Emaranhados neurofibrilares ( <i>neurofibrillary tangles</i> )
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>nNOS</b>	Sintetase do óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric oxide</i> )
<b>NOS</b>	Sintetase do óxido nítrico ( <i>Nitric oxide synthase</i> )
<b>PARP</b>	Polimerase poli-ADP-ribose ( <i>poli-ADP-ribose polymerase</i> )
<b>PET</b>	Tomografia por emissão de positrões ( <i>Positron emission tomography</i> )
<b>PHF</b>	Filamentos helicoidais emparelhados ( <i>paired helical filaments</i> )
<b>PP1</b>	Fosfatase 1 ( <i>phosphatase 1</i> )
<b>PP2A</b>	Fosfatase 2A ( <i>phosphatase 2A</i> )
<b>PP2B</b>	Fosfatase 2B ( <i>phosphatase 2B</i> )
<b>PP5</b>	Fosfatase 5 ( <i>phosphatase 5</i> )
<b>Pré-mRNA</b>	Ácido ribonucleico pré-mensageiro ( <i>Pre-messenger Ribonucleic Acid</i> )
<b>PS</b>	Presinilina
<b>PS1</b>	Presinilina-1
<b>PS2</b>	Presinilina-2
<b>P-tau</b>	Tau fosforilada
<b>PVDF</b>	Difluoreto de polivinilideno ( <i>polyvinylidene difluoride</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribossomal ( <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> )
<b>rNMDA</b>	Receptor do N-metil-D-aspartato
<b>RNS</b>	Espécies reactivas de azoto ( <i>Reactive nitrogen species</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio ( <i>Reactive oxygen species</i> )

<b>SDB</b>	Tampão em semi-seco ( <i>Semi-Dry Buffer</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforese num gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio ( <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SIN-1</b>	<i>5-amino-3-(4-mopholiny)-1,2,3-oxidiazolium chloride</i>
<b>SLS</b>	<i>Sodium Lauryl Sarcosine</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	Placas senis ( <i>senile plaques</i> )
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factores de necrose tumoral $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferência ( <i>Transfer Ribonucliec Acid</i> )
<b>t-tau</b>	Tau total
<b>UCHL1</b>	Terminal carboxilo da hidrolase L-1 da ubiquitina ( <i>ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1</i> )
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b><math>\beta</math>-APP</b>	Proteína precursora do $\beta$ -amilóide ( <i><math>\beta</math>-amyloid protein precursor</i> )

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Hipótese da Cascata Amilóide.....	4
<b>Figura 2</b> Demonstração esquemática da Hipótese metabólica/transdução de Sinal .....	6
<b>Figura 3</b> Descrição esquemática do metabolismo da tau .....	8
<b>Figura 4</b> Representação esquemática do gene humano da tau .....	10
<b>Figura 5</b> Representação esquemática dos domínios funcionais da maior isoforma da tau .....	11
<b>Figura 6</b> Stress oxidativo e falha mitocondrial .....	17
<b>Figura 7</b> Neurotoxicidade do óxido nítrico na Doença de Alzheimer .....	20
<b>Figura 8</b> Quantidade de nitritos libertada pelos doadores de NO .....	39
<b>Figura 9</b> Evolução no tempo da formação de nitritos .....	40
<b>Figura 10</b> Efeito dose-resposta dos doadores de NO na proteína tau total .....	41
<b>Figura 11</b> Efeito dos doadores de NO na proteína tau dependente do tempo .....	42
<b>Figura 12</b> Morfologia das células SH-SY5Y tratadas com os doadores de NO.....	43
<b>Figura 13</b> Efeito dos doadores de NO na viabilidade celular.....	44
<b>Figura 14</b> Separação electroforética do RNA extraído das células SH-SY5Y .....	46
<b>Figura 15</b> Efeito dos doadores de NO na proteína tau na presença ou ausência de cicloheximida.....	47
<b>Figura 16</b> Efeito dos doadores de NO na proteína tau na presença ou ausência de actinomicina D.....	48
<b>Figura 17</b> Localização da proteína tau nas células SH-SY5Y .....	50
<b>Figura 18</b> Localização de neurofilamentos nas células SH-SY5Y .....	51

**LISTA DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 1</b> Anticorpos primários usados para <i>Western blot</i> .....	32
<b>Tabela 2</b> Anticorpos secundários usados para <i>Western blot</i> .....	33
<b>Tabela 3</b> Anticorpos primários usados para imunofluorescência .....	37
<b>Tabela 4</b> Anticorpos secundários usados para imunofluorescência .....	37



# *I - Introdução*

## **1. A Doença de Alzheimer**

Primeiramente identificada por Alois Alzheimer em 1906 [27], a doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurológica progressiva associada ao envelhecimento [53] e irreversível [27]. É clinicamente caracterizada por um declínio gradual do conhecimento, funções diárias, alterações comportamentais [55] como alucinações e delírios [52], comprometimento da memória, linguagem, emoção e personalidade [51]. Esta doença começa com uma grande dificuldade em adquirir novas aprendizagens e em memorizar, levando ao esquecimento de eventos recentes [53].

A DA piora ao longo do tempo [53], resultando em demência severa [7], levando normalmente à dificuldade em encontrar palavras e a raciocinar, dificuldade para completar actividades normais, dependendo dos outros para tal [53], podendo eventualmente levar à morte dos indivíduos afectados numa média de nove anos após o seu diagnóstico [22]. Embora a duração média da DA seja cerca de oito anos, pode alargar-se, no máximo, a vinte anos [27].

A DA pode ser esquematicamente dividida em três fases [48]: inicial/leve, moderada e severa [27]. A fase pré-clínica ou inicial/leve ocorre entre dez a quinze anos durante a qual ocorrem lesões histológicas cerebrais sem provocar sintomas clínicos. A fase pré-demencial ou moderada verifica-se entre dois a cinco anos caracterizada por uma síndrome puramente amnésica acompanhada por um decaimento de motivação e uma depressão emocional. Durante esta fase, o indivíduo é geralmente autónomo. Na fase final ou severa, a demência é associada com amnésia e um ou mais défices das funções cognitivas (afasia, apraxia, agnosia, função executiva, etc.) e a sua autonomia restringe-se gradualmente até à sua perda completa [48].

### **1.1. Epidemiologia e Etiologia**

Esta doença é a causa mais comum de demência, contribuindo para mais de metade de todos estes casos [27]. Hoje em dia afecta aproximadamente 27 milhões de pessoas em todo o mundo [22], com 4,6 milhões de novos casos cada ano [27]. A prevalência da DA na população dos países desenvolvidos estima-se que corresponde a 5-11% das pessoas a partir dos 65anos, crescendo para 50% em pessoas acima dos 85anos de idade [45].

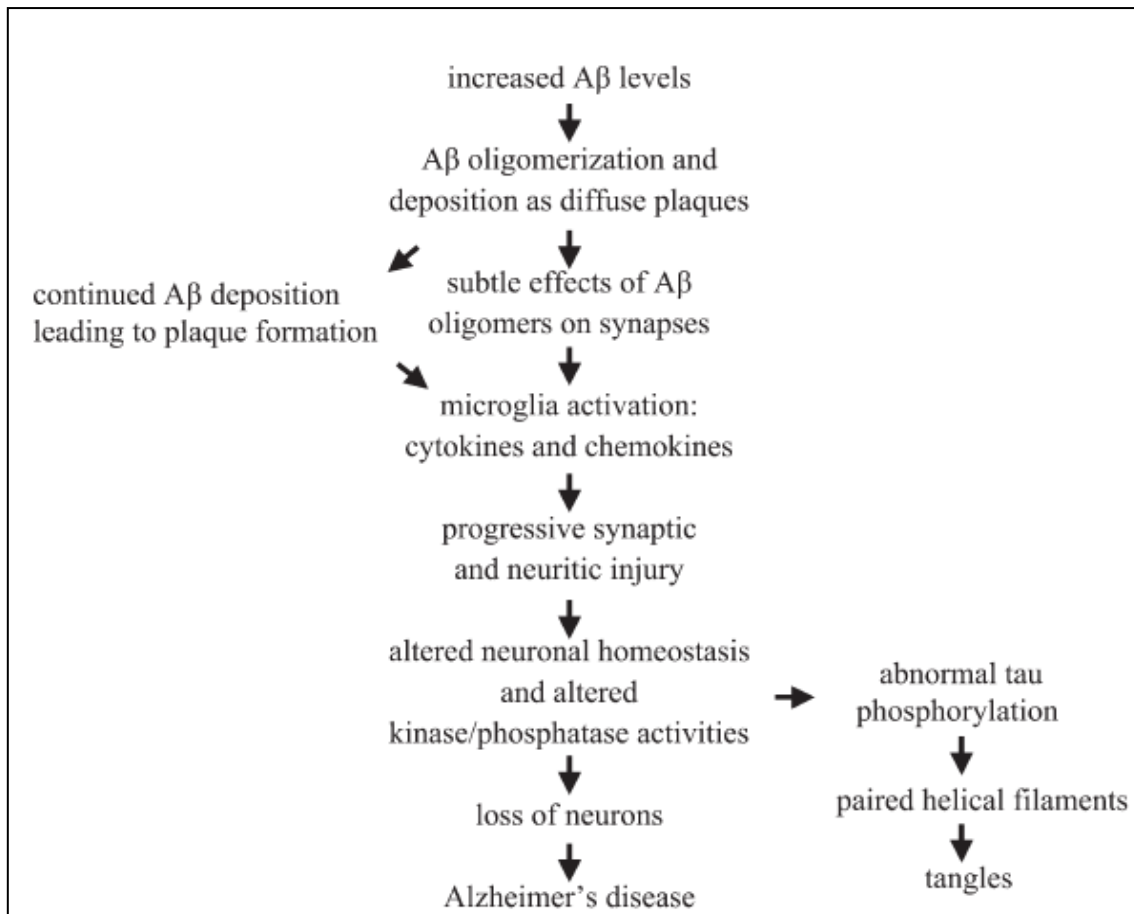
A DA é uma doença multi-factorial e heterogénea [26]. Na vasta maioria dos casos, a doença provavelmente resulta de uma combinação de vários factores, incluindo a idade, genética, características de risco e factores ambientais [55] que afectem uma ou

mais vias de transdução de sinais específicos [25]. A idade é o maior factor de risco conhecido [25], com a incidência da doença aumentando 10% em idosos com mais de 65 anos e para quase metade dos que têm acima de 85 anos [27]. Assim, a doença está dividida em duas categorias baseadas na idade em que se inicia. O início precoce da DA é extremamente raro, contabilizando para apenas ~2% dos casos. Esta desenvolve-se aproximadamente entre os 30 e os 60 anos, e mais de metade de todos estes casos são genéticos, com um amplo padrão de hereditariedade Mendeliana. O início tardio da DA é claramente a forma mais comum desta doença. Esta possui também uma predisposição genética mas parece envolver diversos polimorfismos genéticos, alguns deles ainda sem ser identificados, que aumentam individualmente ou em combinação com o risco de desenvolver DA. Não existe uma incidência maior conforme o sexo ou a raça, mas devido a que as mulheres tendem a viver durante mais tempo que os homens existem mais mulheres com DA [27].

A DA existe sob a forma genética determinada [48], conhecida como Doença de Alzheimer Familiar (FAD – *familial Alzheimer's disease*) [33], com um carácter autossómico dominante; e sob a forma esporádica [48]. A maioria dos casos de DA corresponde à forma esporádica da doença [33], cujo risco aumenta quando presentes alguns factores de risco genéticos [48]. Apenas aproximadamente 5-10% dos pacientes apresentam uma forma de transmissão autossómica, isto é, a FAD [33], nos quais menos de 1% dos casos, a doença é co-originada por certas mutações na proteína precursora do  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ -APP), presinilina-1 (PS1) e presinilina-2 (PS2) [26]. No entanto, mais de 99% dos casos de DA não estão associados com qualquer mutação conhecida, e a natureza do agente etiológicos ainda não é compreendido mas pode envolver anormalidades metabólicas e de transdução de sinais [26], incluindo défices de cálcio intracelular e produção de peroxinitritos por privação de metabolitos, como sejam factores tróficos ou de L-arginina e tetrahidrobiopterina [48]. Além disso, os factores ambientais e o estilo de vida que afecta o metabolismo cerebral, como por exemplo o da glucose, colesterol e espécies reactivas de oxigénio, podem aumentar o risco de desenvolver esta doença [25]. Deste modo, é muito importante a elucidação dos factores que determinam a sequência de mudanças na maquinaria normal de neurónios levando à neurodegeneração, bem como dos mecanismos por trás dos sinais de transdução que determinam a morte neuronal nesta doença [33].

### 1.1.1. Hipótese da Cascata Amilóide

Até agora, a hipótese mais popular para a DA tem sido a “Hipótese da Cascata Amilóide”. De acordo com esta hipótese, que se tornou popular depois da descoberta das mutações na  $\beta$ -APP, que co-origina a DA, o  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A), produto de clivagem do  $\beta$ -APP, é neurotóxico e causa degeneração neuronal, incluindo a patologia neurofibrilar e consequentemente demência (Figura 1) [25].



**Figura 1:** Hipótese da Cascata Amilóide. Um aumento da concentração de péptido  $\beta$ A, sobretudo da forma  $\beta$ A42, é a principal causa para levar às características patológicas da DA (adaptado de [27]).

A sobreprodução de  $\beta$ A, e os mecanismos que daí advém, parece fundamental para a expressão clínica da DA, quer dos casos precoces, esporádico ou familiares [52]. Além disso, a injeção de  $\beta$ A sintético em cérebros de ratos transgênicos de tau acelera a hiperfosforilação da tau e leva à formação de emaranhados semelhantes aos que caracterizam a DA, mas reduzindo a expressão endógena de tau melhora os défices comportamentais nos ratos transgênicos de  $\beta$ -APP [27].

Na verdade, um grande número de indícios genéticos e bioquímicos sugere que os emaranhados neurofibrilares surgem depois do  $\beta$ A. Mais especificamente, dados

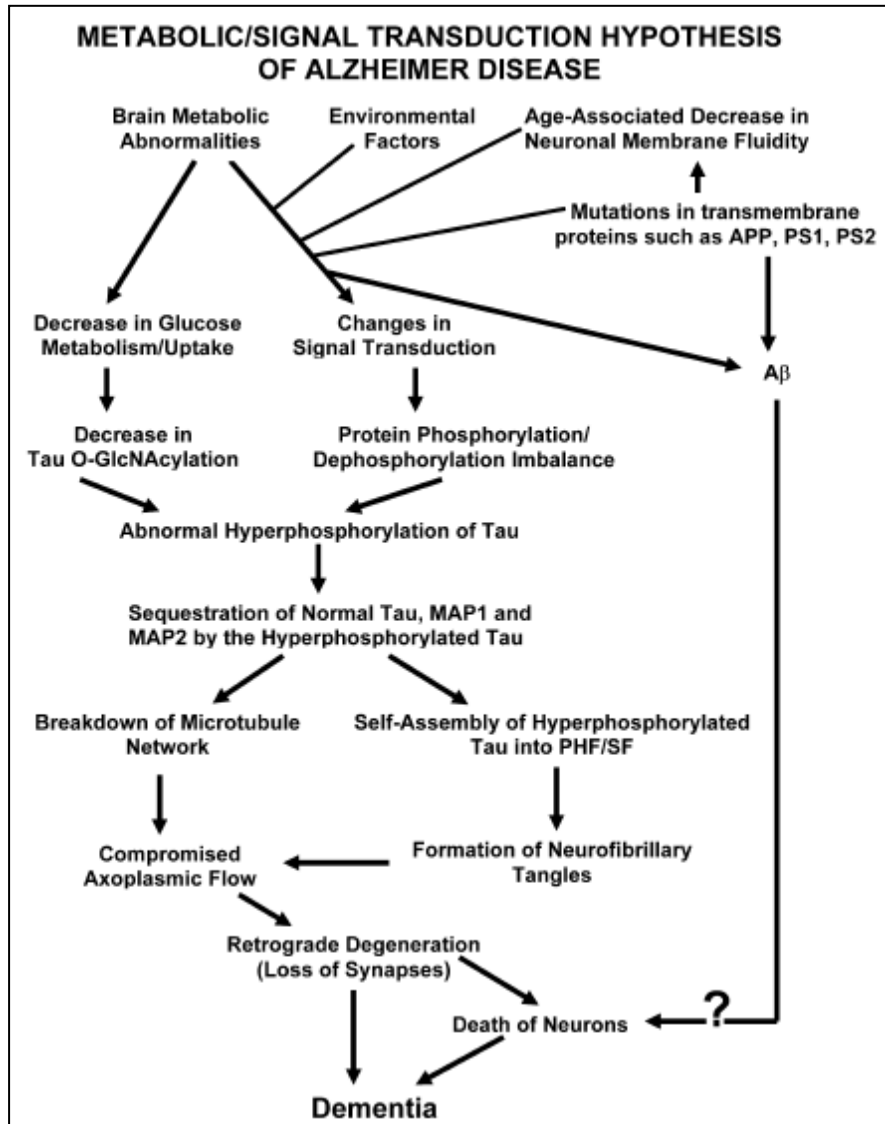
experimentais sugerem que a acumulação anormal de  $\beta$ A desencadeia a patologia tau e esta foi proposta como um mediador essencial da neurotoxicidade induzida pelo  $\beta$ A. Contudo, os passos que ligam o  $\beta$ A à tau continuam sem identificar. Mostrou-se que o  $\beta$ A induz a clivagem da tau mediada pela calpaína, levando à produção de fragmentos tóxicos e induz uma fosforilação anormal da tau em locais relevantes para a doença [27]. No entanto, a DA pode ser causada por vários factores e Hipótese da Cascata Amilóide é demasiado simplista e limitada para explicar esta doença multi-factorial [26].

### **1.1.2. Hipótese metabólica/transdução de sinal**

Embora o depósito de amilóides pareça ser um dos mecanismos activadores da cascata molecular que levam à neurodegeneração, as placas senis por si só não são as únicas modificações responsáveis pela morte neuronal. O processo neurodegenerativo pode ser parte de um mecanismo envolvendo mudanças extra e intracelulares na função neuronal o que significa que é desencadeado pela deposição de  $\beta$ A e outros mecanismos, como por exemplo o stress oxidativo [20]. Propôs-se assim, que várias alterações em vias de transdução e factores metabólicos, através de diferentes mecanismos, levam aparentemente às mesmas duas lesões características desta doença – degeneração neurofibrilar de tau anormalmente hiperfosforilada e  $\beta$ -amiloidose [26] (Figura 2). Assim, esta hipótese é consistente com todos os principais eventos conhecidos envolvidos na patogénese da DA e outras tauopatias relacionadas [25].

A partir da “Hipótese Metabólica/Transdução de Sinal” sabe-se que a DA e outras tauopatias requerem uma predisposição genética. Estas doenças são desencadeadas por vários factores ambientais, afectando uma ou mais vias de transdução de sinais específicas que resultam num desequilíbrio de fosforilação/desfosforilação de proteínas e numa hiperfosforilação da tau, levando à degeneração neurofibrilar e à demência. Este desequilíbrio de fosforilação/desfosforilação de proteínas envolve provavelmente a alteração de uma via de transdução de sinais específica produzida por um aumento nos níveis de um sinal extracelular. As mutações nas proteínas transmembraneares, como a  $\beta$ -APP, PS1 e PS2, aumentam a vulnerabilidade da membrana celular a alteração de sinais de transdução patológicos. Qualquer mutação ou modificação pós-traducional da tau irá torná-la um substrato melhor para a hiperfosforilação e também aumentará o risco para a DA. A diminuição

do metabolismo ou da captação da glucose pode levar à hiperfosforilação da tau através da diminuição na sua O-GlcN-acilação [25].



**Figura 2:** Demonstração esquemática dos passos principais da Hipótese metabólica/transdução de sinal (adaptado de [25]).

## 1.2. Caracterização molecular

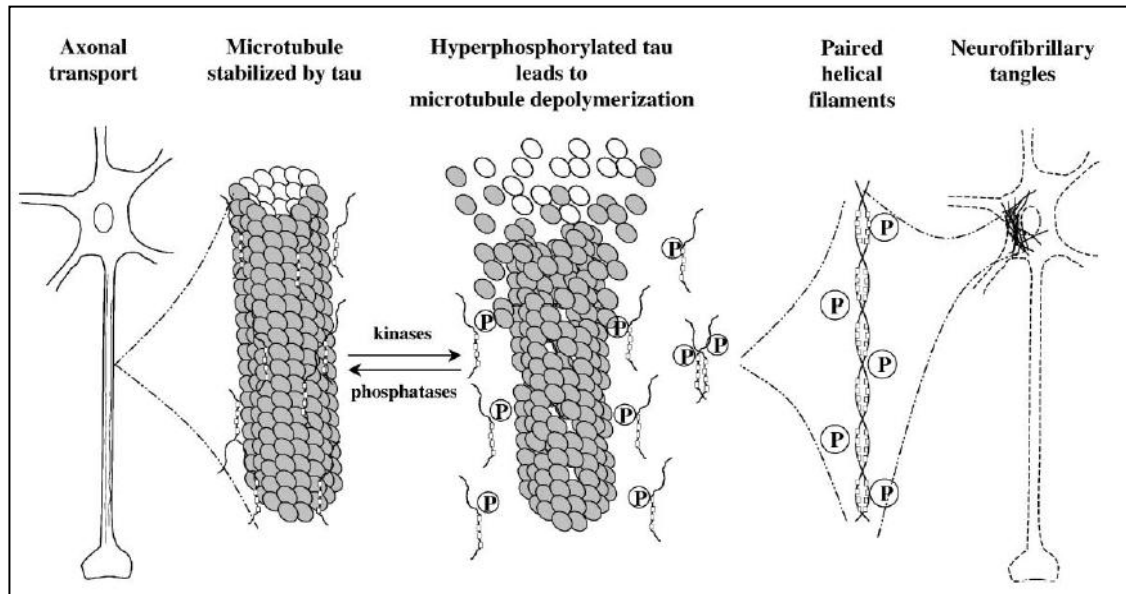
Independentemente da etiologia, a DA é histopatologicamente caracterizada pela presença de placas senis (SPs) e numerosos emaranhados neurofibrilares (NFTs) [26]. A DA é ainda caracterizada patologicamente pela morte neuronal e pela perda das conexões sinápticas em determinadas regiões cerebrais. Deste modo, a perda de memória está potencialmente associada com a diminuição de conexões intraneuronais e a uma diminuição do comprimento das dendrites [7]. As sinapses do hipocampo começam a diminuir nos doentes com défice cognitivo ligeiro (um défice cognitivo que

normalmente precede a demência) e o envelhecimento por si só causa a perda sináptica que afecta particularmente a região do hipocampo [41]. Com a idade existe um decréscimo na fluidez das membranas celulares pelo que a membrana se torna cada vez menos resistente a uma variedade de insultos que afectam determinadas vias de transdução de sinal levando a um desequilíbrio de fosforilação/desfosforilação de proteínas nos neurónios afectados [25]. Verifica-se também uma perda neuronal significativa no núcleo colinérgico do *forebrain* basal que se projectam para as áreas corticais e contribui para os défices de neurotransmissão colinérgica que se observa, e que contribui em parte para o declínio da memória [52].

As SPs são depósitos extracelulares de proteína  $\beta$ A derivados da  $\beta$ APP [51]. A forma mais comum do  $\beta$ A é constituída por 40 aminoácidos, por isso denominado  $\beta$ A40. O  $\beta$ A42, a forma menos abundante desta proteína que difere do  $\beta$ A40 apenas por conter mais 2 resíduos de aminoácidos no C-terminal [27], representa a forma predominante deste péptido depositado nas SPs [52].

Os NFTs são redes de filamentos compactos encontrados principalmente no hipocampo, córtex entorrinal e células da amígdala [20] compostas por proteína tau [51]. A proteína tau hiperfosforilada, resultante do desequilíbrio entre sistemas de proteínas cinases e fosfatases, foi referida como o principal componente dos filamentos helicoidais emparelhados (PHFs – *paired helical filaments*), que são elementos insolúveis do citoesqueleto com uma elevada actividade de auto-agregação que contribui para a formação dos NFTs [20] (Figura 3).

Os neurónios com emaranhados neurofibrilares são frequentemente encontrados na proximidade dos depósitos de amiloide e o seu aparecimento temporal e espacial reflecte mais a severidade da doença do que o aparecimento das placas amilóides. Contudo, os emaranhados neurofibrilares não são específicos da DA, sendo encontrados também em outras doenças (por exemplo, panencefalite subaguda esclerosante e paralisia supranuclear progressiva) não associadas com a disfunção cognitiva e perda de memória que caracteriza a DA [27].



**Figura 3:** Descrição esquemática do metabolismo da tau levando à degeneração dos neurónios na DA. A hiperfosforilação da tau (P) resulta num desequilíbrio na relação de fosfatases e cinases levando à separação da proteína tau dos microtúbulos e consequentemente à sua desestabilização. A tau hiperfosforilada polimeriza-se para formar PHFs e agregados, originando NFTs, levando à neurodegeneração (adaptado de [48]).

### 1.3. Diagnóstico e tratamento

Numa pessoa viva, não existe um teste de diagnóstico preciso que confirme a DA. O diagnóstico de uma provável DA é alcançado pela exclusão de outras condições que podem explicar os sintomas observados. Actualmente, a ferramenta de diagnóstico mais importante para os médicos são os testes neuropsicológicos e do estado mental [27].

Nos doentes de Alzheimer, os níveis de A $\beta$ 42 no líquido céfalo-raquidiano (LCR) estão normalmente reduzidos cerca de 50% relativamente aos controlos. No entanto, apenas a medida de A $\beta$ 42 no LCR é insuficiente para discriminar entre a DA e outras demências. O nível de A $\beta$ 40 no LCR mantém-se inalterado ou ligeiramente aumentada nesta doença, assim consequentemente verifica-se uma diminuição da razão de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 no LCR. A DA está também associada com um aumento significativo nos níveis de tau fosforilada (P-tau) no LCR [27], bem como de tau total (t-tau), pois foi sugerido que os níveis de t-tau no LCR reflectem a extensão dos danos axonais e da degeneração neuronal [20]. Assim, combinando a medição da tau total, A $\beta$ 42 e P-tau, pode identificar-se DA em doentes com comprometimento cognitivo com uma precisão relativamente elevada [27]. No entanto, os marcadores no LCR para a DA não se devem



usar isoladamente, os testes e o diagnóstico clínico da DA deve basear-se na informação cumulativa adquirida pela examinação clínica, imagem cerebral e análises bioquímicas [20]. Assim, actualmente existem pelo menos quatro métodos que permitem ajudar no diagnóstico desta doença: análise do  $\beta$ A no LCR; visualização das placas amilóides através de uma tomografia por emissão de positrões (PET – *Positron emission tomography*); análise do  $\beta$ A no sangue periférico e medida da t-tau e/ou P-tau no LCR [27].

Contudo, um diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer requer não só a presença de demência severa mas também a confirmação *post-mortem* [27]. Em autópsias, quando o cérebro de um doente de Alzheimer é examinado ao microscópio é possível observar células anormais e estruturas celulares [53], emaranhados e placas [27], particularmente em áreas do cérebro relacionadas com a memória [53]. Os estudos *post-mortem* de cérebros de doentes de Alzheimer mostram uma atrofia cortical com uma perda de 8 a 10% do peso cerebral em cada dez anos da progressão da doença [48].

O tratamento para a DA depende da descoberta dos mecanismos celulares responsáveis pela expressão da demência e pelos sintomas iniciais da memória [53]. Até agora, não existe um tratamento eficaz que possa prevenir a progressão da DA; as drogas disponíveis apenas podem impedir o agravamento dos sintomas [27]. Nas últimas três décadas, os padrões de tratamento para a DA têm sido inibidores da acetilcolinesterase, para melhorar a função cognitiva, e outras drogas para manipular a perturbação de humor, agitação e psicose que normalmente ocorrem nos estágios mais tardios da doença. Recentemente, a memantina, um antagonista dos receptores do N-metil-D-aspartato (nNMDA) e um agente potencialmente neuroprotector, tem sido também amplamente usado [22].

## **2. A Proteína Tau**

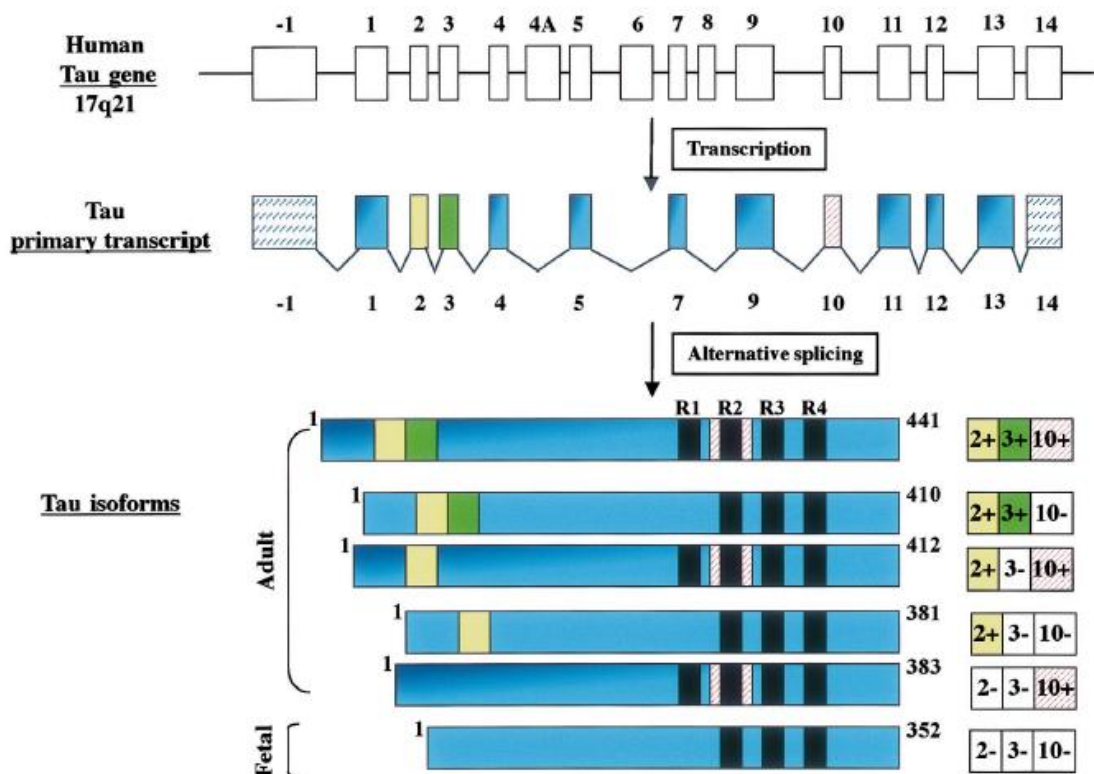
A proteína tau foi descoberta como uma proteína associada a microtúbulos (MAP – *microtubule-associated protein*) [22], que desempenha um dos papéis mais importantes na associação e estabilização dos microtúbulos, e liga estes polímeros a outros filamentos do citoesqueleto [20] dentro da célula [48]. Ao fazê-lo, a tau origina um estado parcialmente estável nos microtúbulos, embora ainda dinâmico, importante para o crescimento e transporte axonal eficaz. Ou seja, como um dos principais componentes do citoesqueleto, os microtúbulos, estão envolvidos na manutenção da morfologia neuronal e na formação dos prolongamentos axonais e dendríticos [21]. A

proteína tau é também um poderoso promotor de polimerização da tubulina nos microtúbulos [48].

Esta proteína foi isolada pela 1ª vez em 1975 como uma proteína que se co-purifica com tubulina e tem a capacidade de promover a associação de microtúbulos *in vitro* [21], e sob condições fisiológicas localiza-se predominantemente nos axónios neuronais, no citoesqueleto e nos sistemas de transporte intracelular [20]. Porém, numa forma de fosforilação distinta, a proteína tau está também presente no compartimento somato-dendrítico dos neurónios, bem como nos astrócitos e células da glia [21], principalmente em condições patológicas [5].

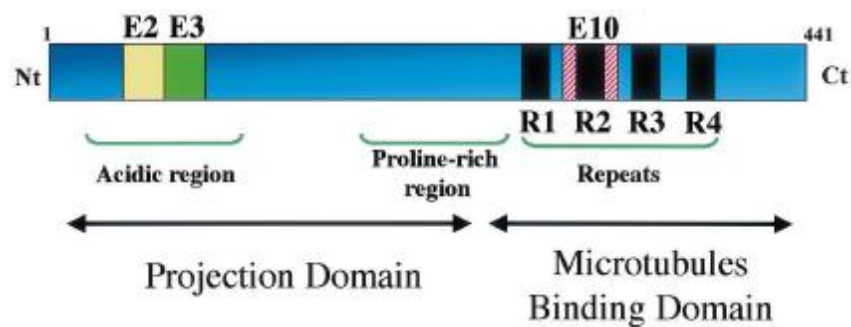
## 2.1. Genética

A proteína tau é codificada pelo gene *MAPT* [21] localizado no braço longo do cromossoma 17 (posição 17q21) [22], ocupa mais de 100kb e contém 16 exões [29]. No cérebro humano adulto, este gene codifica seis isoformas de tau em resultado de *splicing* alternativo [22] dos exões 2, 3 e 10 do seu mRNA [21], variando os seus comprimentos entre 352 e 441 aminoácidos (Figura 4) e todas possuem mais de 21 locais de fosforilação [20].



**Figura 4:** Representação esquemática do gene humano da tau. Transcrito primário da tau humana e as seis isoformas de tau humana no SNC (adaptado de [5]).

Estas seis isoformas diferem umas das outras pela presença ou ausência de uma ou duas inserções (29 ou 58 aminoácidos) na parte N-terminal e pela presença de três ou quatro repetições na metade C-terminal. As inserções da parte N-terminal são elevadamente acídicas e as repetições na metade C-terminal da tau são domínios através dos quais a tau se liga ao microtúbulos [22] (Figura 5). As isoformas com quatro repetições (4R-tau) ligam microtúbulos com maior afinidade que as isoformas com três repetições (3R-tau) e podem até deslocar a ligação prévia da isoforma 3R-tau [21]. Cada uma das seis isoformas possui possivelmente o seu papel fisiológico particular e actividades biológicas diferenciadas, uma vez que são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento e estimulam a associação de microtúbulos com eficiências diferentes [22].



**Figura 5:** Representação esquemática dos domínios funcionais da maior isoforma da tau (2+3+10+) (adaptado de [5]).

A tau é modificada pós-traducionalmente por várias vias, quer em condições normais ou patológicas. Estas modificações incluem fosforilação, glicosilação, ubiquitinação, glicação, poliaminação, nitração, truncamento e agregação [22].

Através da codificação genética, a tau não se encontra geneticamente ligada à DA, pois mutações no gene *MAPT* dão origem à demência fronto-temporal com Parkinsonismo ligado ao cromossoma 17 (FTDP-17), e as mutações *missense* também foram encontradas na paralisia supranuclear progressiva, degeneração cortico-basal e em condições que se assemelham à Doença de Pick, evidenciando assim que a perturbação da homeostase da tau é suficiente para causar neurodegeneração. As mutações da tau são conhecidas por alterar a proporção relativa de várias isoformas da tau, comprometendo a sua capacidade de ligar e promover a associação de microtúbulos, ou reforçando a agregação da tau em filamentos [21].

## 2.2. Fosforilação da Tau e Implicações Patológicas

Em 1977 descobriu-se que a proteína tau era uma fosfoproteína [22]. Como referido anteriormente, as duas principais funções conhecidas da proteína tau são a sua capacidade de promover a associação e manter a estrutura dos microtúbulos. Estas funções são reguladas pelo seu nível de fosforilação [26]. O estado fosforilado da proteína tau parece resultar de um balanço entre a actividade de cinases, como a cinase-3 $\beta$  da sintetase do glicogénio (GSK-3 $\beta$ ), a cinase 5 dependente de ciclinas (cdk5) [52] e MAP cinases (MAPK) como ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e p38 MAPK [26], e de fosfatases [48], principalmente pela fosfatase 2A (PP2A) e, em menor extensão, pela fosfatase 1 (PP1), fosfatase 2B (PP2B) e fosfatase 5 (PP5) [21].

A desfosforilação da proteína tau promove a rápida e extensiva polimerização de microtúbulos, contudo a sua fosforilação diminui a sua capacidade de promover a associação dos microtúbulos (Figura 3). No cérebro adulto normal, a proteína tau encontra-se relativamente fosforilada e o equilíbrio entre a sua fosforilação e desfosforilação modula a estabilidade do citoesqueleto e a morfologia axonal [20]. Embora menos bem estudado, a fosforilação também regula a ligação da tau a moléculas sinalizadoras e pode por isso influenciar a sinalização mediada por esta proteína [21].

Nunca houve muito interesse em investigar a proteína tau até que se descobriu que esta faz parte dos PHFs dos NFTs nos cérebros de doentes de Alzheimer [22], que são um marcador patológico da severidade da DA [41]. A subunidade proteica principal dos emaranhados neurofibrilares/filamentos helicoidais emparelhados foi identificada por *Western blot* como proteína tau associada a microtúbulos em 1986. Neste mesmo ano, demonstrou-se que, na DA, a tau se encontra anormalmente hiperfosforilada e, deste modo, polimerizada em PHF [26]. Além disso, a tau citosólica hiperfosforilada, que pode representar cerca de 40% da tau anormal total nos cérebros de doentes de Alzheimer, não interage com tubulina/microtúbulos mas consegue sequestrar tau normal, e outras proteínas associadas a microtúbulos como a MAP1 e MAP2, causando inibição e dissociação dos microtúbulos “*in vitro*” [25]. Subsequentemente, a instabilidade dos microtúbulos e do citoesqueleto leva ao comprometimento do transporte axonal para os terminais pré e pós-sinápticos, causando deficiências de energia e nutrição desses locais [52]. Deste modo os NFTs serão uma consequência da desregulação dos mecanismos de fosforilação/desfosforilação da tau [48].

Os emaranhados neurofibrilares aparecem na DA e outras doenças neurodegenerativas denominadas tauopatias [41], como a FTDP-17, paralisia supranuclear progressiva, doença de Pick e degeneração cortico-basal [21], e acumulam-se intracelularmente no citoplasma neuronal [52]. Para tal são requeridas elevadas concentrações de tau, assim, níveis elevados de tau livre, não ligada a microtúbulos, irá presumivelmente promover a associação da tau em oligómeros e pode aumentar a probabilidade de se tornar *misfolded*, bem como sofrer modificações ou mudanças conformacionais que promovem a formação de inclusões filamentosas insolúveis [21].

O facto de que a disfunção da tau pode levar a doenças neurodegenerativas indica que a proteína tau possui um papel crítico na função neuronal. A desagregação farmacológica dos microtúbulos e a inibição de fosfatases da tau originam uma falha axonal semelhante e uma falha sináptica [41].

A acumulação de agregados proteicos é uma característica de várias doenças neurológicas caracterizadas pela disfunção neuronal e eventual morte celular [21]. Tal como os oligómeros de  $\beta A$ , os agregados intermediários de moléculas de tau anormais são citotóxicos e comprometem a função neuronal [41]. Contudo, a base molecular da toxicidade causada pela tau anormal continua na área de interesse da investigação. Estudos anteriores mostraram uma forte correlação entre o número de NFTs no cérebro e a severidade da demência, sugerindo que os agregados de NFTs podem causar neurodegeneração. Esta hipótese foi recentemente contestada por estudos que demonstraram que a tau anormal não-polimerizada ou os seus oligómeros, ao contrário dos PHFs altamente polimerizados, são tóxicos [22]. Adicionalmente, outros estudos mostram também que a perda sináptica é maior em animais transgénicos que expressam tau mutante de pró-agregação comparando com animais que expressam mutações de anti-agregação. Isto sugere que a capacidade da tau para formar oligómeros provavelmente acelera o declínio sináptico ao mesmo tempo que apoia a noção que a formação de filamentos não é necessária para a perda sináptica [21]. Na verdade, os filamentos helicoidais insolúveis podem ser inertes, uma vez que a diminuição do transporte axonal e do número de neurónios é independente da quantidade de emaranhados neurofibrilares. Além disso, a agregação das espécies tóxicas intermediárias de proteína tau em filamentos helicoidais pode corresponder a um processo protector [41], através do qual os neurónios reduzem a actividade tóxica da tau hiperfosforilada [22].

Existem inúmeras evidências experimentais que apoiam a opinião que a tau hiperfosforilada desempenha um papel patológico nas tauopatias. Por exemplo, a expressão tau pseudo-fosforilada, que mimetiza a hiperfosforilação da doença, causa apoptose nas células neuronais, um efeito não observado quando as células expressam tau do “tipo selvagem” [21]. Contudo, após a desfosforilação, a proteína tau perde esta capacidade tóxica [22], voltando a ganhar a sua capacidade de ligação aos microtúbulos [48].

### **2.3. Ubiquitinação da Tau**

A tau encontra-se associada a ubiquitina num grande número de emaranhados maduros [26]. A ubiquitina é uma proteína implicada no sistema de degradação celular de proteínas desnaturadas. A acumulação intraneuronal destas estruturas insolúveis danifica as funções citoplasmáticas e o transporte axonal, e leva à morte celular. A associação da ubiquitina com a tau-PHF pode ser explicada por um esforço por parte da célula para eliminar estes agregados. Quando esta proteólise não é eficaz a tau-PHF continua a acumular-se perturbando as comunicações intracelulares e destruindo os neurónios [48].

A análise proteómica demonstrou que o terminal carboxilo da hidrolase L-1 da ubiquitina (UCHL1 – *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1*) se encontrava oxidativamente modificado, um resultado já anteriormente confirmado. A UCHL1, como parte do sistema ubiquitina–proteossoma, necessária para a degradação de proteínas, tem sido implicada na morte de neurónios em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, de Alzheimer e de Huntington. A principal função do sistema ubiquitina–proteossoma é a degradação de proteínas *misfolded*, danificadas ou de vida-curta. Além disso, o sistema ubiquitina–proteossoma pode desempenhar um papel na regulação da morte celular activa [7].

## **3. Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO) é um gás livremente difusível [31], primeiramente identificado como um factor relaxador dos vasos sanguíneos derivado do endotélio. Posteriormente, foi reconhecido por desempenhar um papel central na comunicação intercelular, bem como na sinalização intracelular [13] como um mensageiro com múltiplas funções nos sistemas cardiovascular, imunológico e nervoso [19]. É produzido por diferentes tipos de células em organismos multicelulares [12] durante a

conversão de L-arginina a L-citrulina, numa reacção catalisada pela sintetase do óxido nítrico (NOS) cujas formas clássicas são a neuronal (nNOS), indutível (iNOS) e a endotelial (eNOS) [1].

Estas três isoformas derivam de genes separados e são reguladas por diversas vias de sinalização [1]. A nNOS é expressa constitutivamente por neurónios específicos e amplamente distribuída no sistema nervoso dos mamíferos [19], encontrando-se no cerebelo, hipocampo, estriado, hipotálamo e medula oblongata [48]. A iNOS foi inicialmente descrita em macrófagos e outras células envolvidas na inflamação e encontra-se permanentemente activa quando expressa [19], descobriu-se ainda que a sua expressão é também indutível em vários outros tecidos [31]. A eNOS, constitutivamente expressa nas células do endotélio de todos os tipos de vasos, contribui para a dilatação dos vasos sanguíneos e previne a agregação plaquetária e a proliferação das células do músculo liso vascular [19]. Das duas, as isoformas nNOS e eNOS, são dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto a isoforma indutível é independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Foi ainda descoberto que os neurónios também podem expressar eNOS e que a expressão de iNOS pode ser induzida por citocinas em culturas neuronais [31].

### **3.1. Importância do NO**

O NO é um mediador importante tanto de processos fisiológicos como patofisiológicos; este regula o tônus vascular, agregação plaquetária, adesão leucocitária, proliferação das células do músculo liso, neurotransmissão sináptica e acções citotóxicas/citostáticas dos macrófagos [1]. De facto, tem-se referido um papel duplo do NO, com acções benéficas ou citotóxicas, dependendo da sua concentração e do ambiente em que a célula se encontra [19] bem como da formação diferencial do radical livre NO ( $\text{NO}^\bullet$ ), catião nitrosónio ( $\text{NO}^+$ ), nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) ou nitrato ( $\text{NO}^{3-}$ ) [24]. Enquanto quantidades pequenas de NO desempenham funções benéficas, como por exemplo baixar a pressão sanguínea, quantidades excessivas, ou a sua combinação com radicais livres de oxigénio, originam efeitos prejudiciais como morte celular associada à isquémia ou a algum processo inflamatório ou degenerativo [19]. Além disso, inibe também enzimas em células alvo e pode interagir com radicais derivados de oxigénio ou ROS livres para produzir substâncias tóxicas [1].

Por si só, o NO é um radical livre, mas em combinação com superóxido forma o anião peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) extremamente reactivo [39] que se degrada ao radical livre hidroxilo, um dos radicais livres mais reactivos, que pode danificar DNA, proteínas e



lípidos [24]. Na verdade, muitos dos efeitos prejudiciais do NO tem sido atribuído ao anião  $\text{ONOO}^-$  devido a que esta molécula tem a capacidade de nitrificar e oxidar resíduos de proteínas bem como de catecolaminas, DNA e lípidos, afectando deste modo a homeostase celular [39].

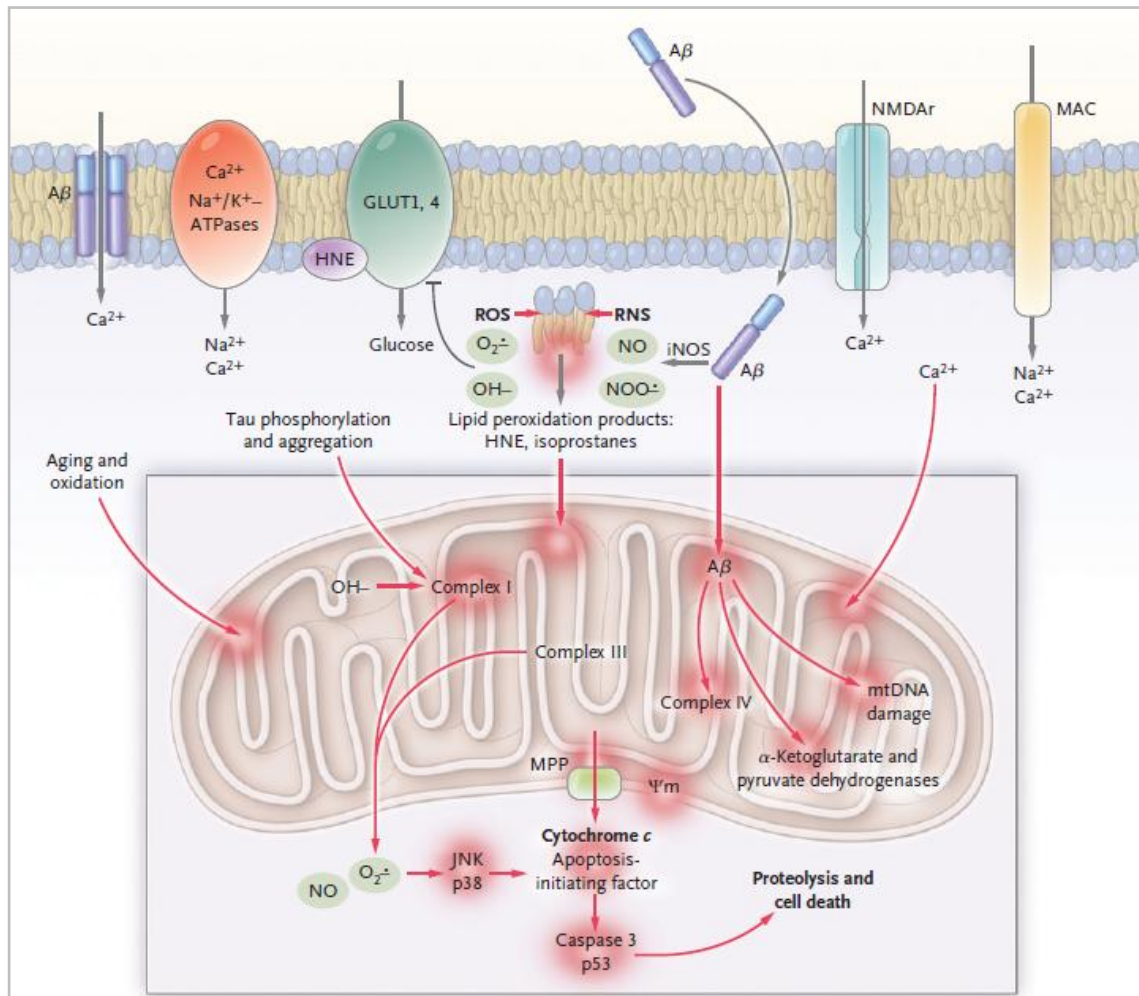
### **3.2. Óxido Nítrico no Sistema Nervoso**

Desde que se descobriu o papel do NO como uma molécula mensageira cerebral, agindo como neurotransmissor/neuromodulador não-convencional, um grande número de estudos tem referido as suas acções multifactoriais na fisiologia do cérebro, entre elas a sua implicação nos diversos tipos de danos neuronais quando sobre-produzido e quando a sua libertação escapa dos mecanismos de controlo contribuindo para os processos neurodegenerativos [12]. No sistema nervoso central, o NO está envolvido em funções que vão desde a aprendizagem, plasticidade sináptica, sono, neuro-secreção e apetite até à homeostase da temperatura [31]. Por exemplo, modula a libertação de neurotransmissores, contribuindo para a formação e remodelação de sinapses e participa no controlo do fluxo sanguíneo cerebral entre outras acções [19].

Para além do seu suposto papel na memória e aprendizagem, o NO parece participar também na remodelação axonal durante o desenvolvimento através da interacção com proteínas existentes nos terminais axónicos durante o crescimento axonal e na sinaptogénese [30]. De facto, a formação de NO é um dos factores mais importantes que contribui para a perda de neurónios em casos de isquémia, doenças de desmielinização e outras doenças neurodegenerativas [39]. A desregulação da produção e libertação de NO tem sido portanto proposta como um importante factor primário ou agravador em diversas patologias neurodegenerativas, quer agudas ou crónicas [12].

O NO exerce o seu efeito neurotóxico através de diversos mecanismos. Como referido anteriormente, este é um radical livre e pode combinar-se com aniões superóxido para formar peroxinitrito, outro radical altamente destrutivo [30], podendo deste modo originar stress nitrosativo e oxidativo através de nitroação, nitração ou nitrosilação das várias moléculas orgânicas, peroxidação lipídica, dano do DNA, comprometimento da função mitocondrial e eventualmente morte neuronal [12]. De facto, a produção excessiva de NO foi também correlacionada com a morte neuronal causada pela falha da respiração mitocondrial (Figura 6). Descobriu-se que o NO bloqueia, de um modo reversível, a enzima citocromo oxidase mitocondrial através da competição com o oxigénio [31].





**Figura 6:** Stress oxidativo e falha mitocondrial. No centro, o péptido  $\beta$ A retrata a produção de ROS e de RNS. O seu ataque peroxidativo na célula e nos lípidos membranares dos organelos origina toxinas mitocondriais. Danos oxidativos ligados à membrana, ATPases específicas de iões e o estímulo de mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  como por exemplo, nos receptores NMDA do glutamato (rNMDA), complexo de ataque à membrana (MAC) do sistema do complemento e formação de poros de  $\beta$ A selectivo para iões, originam um aumento de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e mitocondrial. O  $\beta$ A ataca directamente o complexo IV do transporte de electrões (citocromo *c* oxidase) e enzimas chave do ciclo de Krebs (desidrogenases do  $\alpha$ -cetoglutarato e do piruvato) e origina dano do DNA mitocondrial DNA (mtDNA), levando à sua fragmentação. Produtos da peroxidação lipídica também promovem a fosforilação e agregação da tau, que por sua vez inibe o complexo I. Quantidades exageradas de ROS e RNS são originadas nos complexos I e III. Como o potencial de membrana mitocondrial (MPP) colapsa são activadas caspases. O  $\beta$ A também induz as proteínas cinases activadas por stress p38 e JNK bem como a p53, que se encontra ligada a fenómenos de apoptose. Deficiências de substratos, nomeadamente de NADH e glucose, em combinação com a quebra no transporte de electrões diminuem a produção de ATP (adaptado de [41]).

Além disso, o NO, nitrosotióis e peroxinitritos encontram-se implicados na inactivação reversível dos complexos mitocondriais I e II [31]. Assim, a produção aumentada de NO pode levar à toxicidade celular e morte através de uma variedade de vias e mecanismos [30].

### **3.2.1. Óxido Nítrico e a Doença de Alzheimer**

Sabe-se que o NO se encontra envolvido em várias doenças neurológicas. Recentemente, os investigadores começaram a reconhecer e a explorar a possível ligação entre o NO e a DA. Embora a sua associação não seja muito frequente, têm surgido dados que mostram mudanças no sistema da NOS relacionadas com a DA, parecendo que o NO pode estar relacionado com muitos dos mecanismos patológicos desta doença [30]. De facto, o efeito que a NOS tem no cérebro e no tecido vascular é um factor muito importante a considerar antes da observação de qualquer deposição de  $\beta$ A, devido à sua resposta compensatória para estimular o tecido [1].

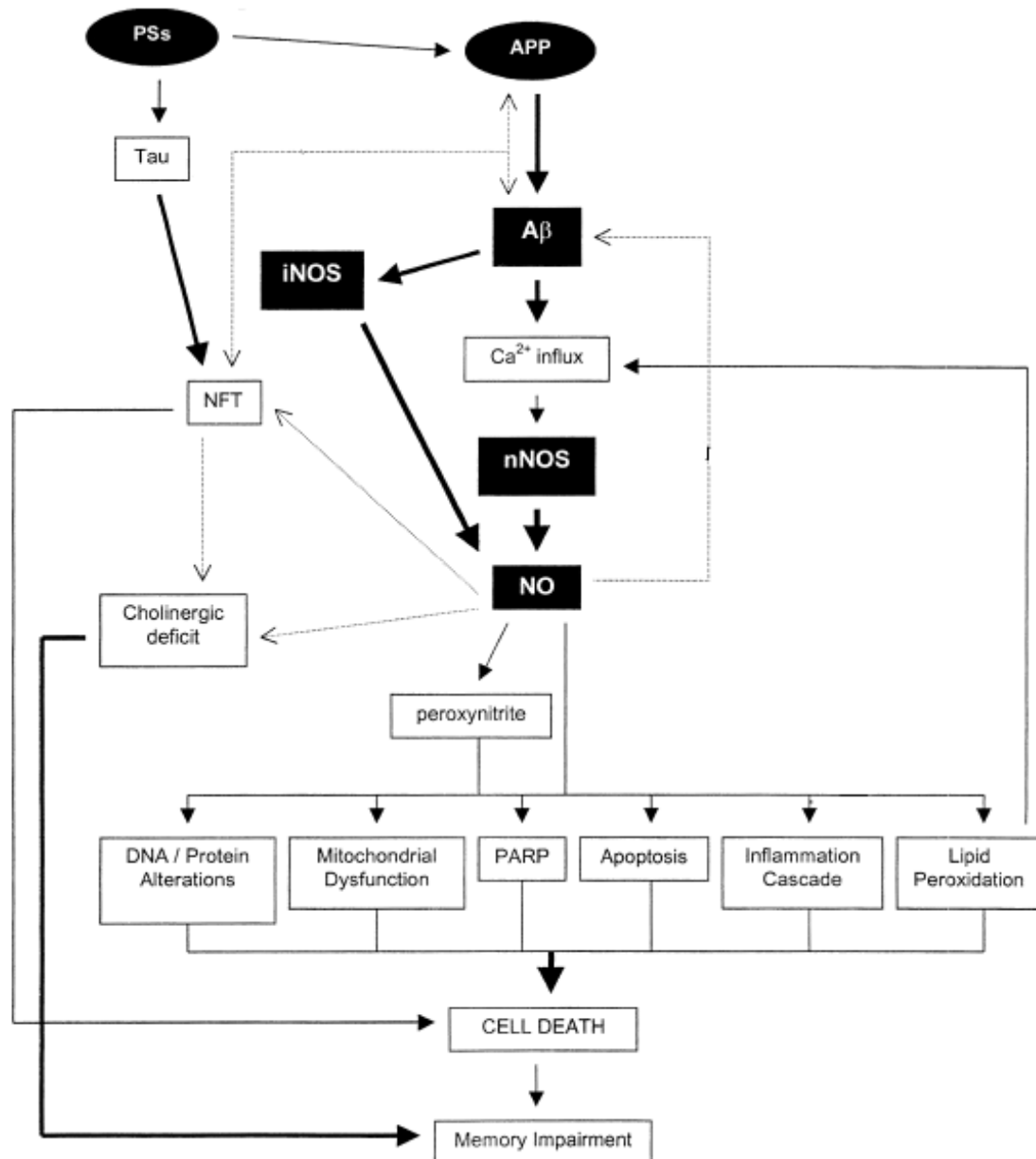
A capacidade que o NO tem para exercer danos celulares é devido às suas propriedades oxidativas, que é talvez o seu mecanismo neurotóxico primário [30]. De facto, o stress oxidativo aumentado acelera a acumulação das proteínas  $\beta$ A e tau na DA, e também modelos experimentais mostram que os marcadores de stress oxidativo precedem as mudanças patológicas da DA [41]. Além disso, o stress oxidativo foi também referido como sendo desencadeado por vários factores e condições incluindo a formação de radicais livres,  $\beta$ A, glicosilação e inflamação e pode contribuir para a DA através da promoção de vias de sinalização [25]. Ou seja, o péptido  $\beta$ A é um gerador potente de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (RNS) [41].

O péptido  $\beta$ A pode ainda potenciar a síntese de NO por outros meios. Recentemente, vários laboratórios têm demonstrado que o  $\beta$ A estimula a produção de NO pela microglia e astrócitos, pois, na DA, o número de astrócitos reactivos encontra-se aumentado bem como as células da microglia e produzem uma variedade de compostos potencialmente neurotóxicos, incluindo superóxidos, glutamato e NO [30]. Quando comparados com controlos, os cérebros de doentes de Alzheimer mostram mais microglia difusamente activada, quer nas proximidades físicas das placas, onde se encontram aglomeradas, quer em volta ou na própria zona lesionada. A co-localização da microglia e astrócitos com as SPs sugerem que estas células são activadas pelo contacto directo com as fibrilas  $\beta$ A. O  $\beta$ A solúvel também se tem demonstrado capaz de

estimular a microglia a secretar citocinas pró-inflamatórias como as quimiocinas, componentes do complemento e radicais livres [52].

Os astrócitos e a microglia são os dois principais tipos de células que participam nas funções imunitárias do cérebro [30]. Embora as células da microglia constituam aproximadamente 10-20% das células gliais, o seu número pode rapidamente aumentar com as placas neuríticas [33]. A activação da microglia causa a libertação de NO mediada pela iNOS [30]. Além disso, a glia activada contribui para a neurotoxicidade através da indução de mediadores inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1) e factores de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) que medeiam a expressão de enzimas inflamatórias indutoras da sintetase do óxido nítrico (iNOS) [33]. O TNF- $\alpha$  também é produzido em resposta à IL-1 durante a DA e interage com outras interleucinas de modo a induzir danos neuronais. Adicionalmente, a neurotoxicidade induzida por TNF- $\alpha$  requer a participação de outras citocinas, como a própria IL-1 e a interleucina 6 (IL-6), a formação de ROS neurotóxicas e mesmo a produção de NO pela microglia e astrócitos, via activação da iNOS [52]. Tem-se demonstrado a agregação dos astrócitos reactivos na proximidade do  $\beta$ A, bem como a presença de citocinas que podem induzir directamente a produção de NO pela iNOS astrocítica ou actuar em sinergia com o  $\beta$ A para induzir a expressão da iNOS nos astrócitos [30]. Também os próprios neurónios são capazes de produzir várias citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A produção destas moléculas pró-inflamatórias pelos neurónios podem ainda desencadear outros processos inflamatórios que pioram o meio envolvente e levam à toxicidade e consequente morte neuronal [51].

Para além da capacidade que o péptido  $\beta$ A tem para originar stress oxidativo, este tem mostrado uma acção sinérgica com o glutamato induzindo danos neuronais através de uma via de indução de NO. Isto é exemplificado no caso da excitotoxicidade glutamatérgica, na qual o aumento da libertação de glutamato vai activar os receptores NMDA pós-sinápticos que leva à entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que por sua vez desencadeia vários processos entre os quais o aumento de iNOS e, deste modo, o aumento de NO [30]. Além disso, a desregulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  apoia a ligação entre o NO e a DA uma vez que este é o principal regulador da expressão de nNOS. Vários estudos têm concluído que o  $\beta$ A pode desregular a



**Figura 7:** Neurotoxicidade do óxido nítrico na Doença de Alzheimer. Mutações das PSs e da  $\beta$ -APP estão associadas com o aumento da produção de  $\beta$ A. A formação de NFTs resulta da hiperfosforilação da tau, que leva à morte celular em consequência da quebra do tráfico celular. O déficit colinérgico é uma das descobertas mais importantes na DA e está implicado nas deficiências de memória observadas nesta doença. A produção aumentada de  $\beta$ A induz a produção de NO quer pela desregulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e subsequente aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ou por interações com células gliais. O NO e os peroxinitritos induzem vários mecanismos neurotóxicos, incluindo alterações no DNA/proteínas, disfunção mitocondrial, sobre-ativação da polimerase poli-ADP-ribose (PARP), apoptose, neuroinflamação e peroxidação lipídica. A formação de NFTs pode influenciar a acumulação do  $\beta$ A e vice-versa, e assim o metabolismo da  $\beta$ -APP pode participar na fosforilação da tau e subsequente formação de NFTs. O NO, através da activação de várias moléculas de sinalização, pode induzir a formação de  $\beta$ A e NFTs (adaptado de [30]).

homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e um dos resultados da elevada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como já referido, é o aumento da produção de NO também pela nNOS, o que pode exercer efeitos neurotóxicos [30].

A produção aumentada de NO resultante por estas diferentes vias levará provavelmente a um aumento da produção de radicais livres e possivelmente à morte celular (Figura 7). Embora o NO não seja o único elemento que causa danos oxidativos na DA, o seu envolvimento parece ser significativo uma vez que se demonstrou que os vários factores patológicos da DA afectam a expressão de NOS [30].

Em cérebros de doentes de Alzheimer tem-se observado danos neuronais mediados quer por NO quer por peroxinitritos, e existem indícios que mostram que o NO pode estar envolvido na origem do  $\beta\text{A}$  e dos NFTs [30]. Deste modo, coloca-se a hipótese de que o NO pode influenciar de algum modo o funcionamento da proteína tau, e assim comprometer a comunicação neuronal levando ao aparecimento da DA.

## *II - Objectivos*

Uma vez que existem referências de que o NO e os peroxinitritos se encontram aumentados em cérebros de Alzheimer, bem como de que o NO pode estar envolvido na origem de uma das principais características moleculares da DA, os NFTs, cujo constituinte principal é a proteína tau, propuseram-se os seguintes objectivos:

- Visualizar o efeito que o NO e os peroxinitritos exercem sobre a proteína tau numa linha celular de neuroblastomas humanos;
- Avaliar a viabilidade celular e a morfologia celular causada pela exposição celular ao NO e peroxinitritos.

# *III – Materiais e Métodos*



## 1. Material:

Os materiais utilizados durante a realização dos estudos deste trabalho foram os seguintes:

- Filmes para revelação do *Western Blot* – *Amersham Bioscience*;
- Filtros Millex de 0,22µm – *Millipore Express*<sup>®</sup>;
- Lâminas e lamelas – *Menzel-Gläser*<sup>®</sup>;
- Membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) – *PerkinElmer*;
- Membrana de nylon Nitran<sup>®</sup> N – *Schleicher & Schuell*;
- Papel de *Whatman*<sup>®</sup>;
- Todo o material de plástico estéril utilizado para cultivos (frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup> com filtro, e placas de cultivo de 20, 35 e 60mm de diâmetro) foi obtido em *TPP*<sup>®</sup>;
- O resto do material de plástico utilizado (tubos de Falcon estéreis de 50 e 15mL, tubos eppendorf, pipetas, etc) foi comprado em *VWR*<sup>®</sup>.

## 2. Instrumentação:

Os materiais utilizados durante as experiências realizadas nesta tese foram os seguintes:

- Aparelho de electroforese Mini-PROTEAN<sup>®</sup>3 – *Bio-Rad Laboratories*;
- Aparelho de transferência “Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry Transfer” – *Bio-Rad Laboratories*;
- Câmara de fluxo laminar TELSTAR AV-100;
- Centrifugas *Eppendorf* 5804R e 5810R;
- Espectrofotômetro UV/Visível *Varian Cary 300 Bio*;
- Fonte de alimentação PowerPac 300 – *Bio-Rad Laboratories*;
- Incubadora CO<sub>2</sub> Water NUAIRE<sup>™</sup> US Autoflow;
- Microscópio invertido *Leica* para observações de rotina no cultivo celular, de fluorescência *Zeiss Axioskop 40*, e confocal;
- Transiluminador UV/Visível – *UVP*.

### 3. Reagentes:

Nas experiências realizadas neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes, das respectivas casas comerciais:

#### A.

- Acetato de sódio – *USB Corporation*;
- Ácido aminocapróico – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Ácido acético – *Panreac Química S.A.*;
- Ácido bórico – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Ácido clorídrico (HCl) – *Panreac Química S.A.*;
- Ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Ácido etileno glicol-tetracético (EGTA) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) – *Panreac Química S.A.*;
- Ácido maléico – *Panreac Química S.A.*;
- Acrilamida (40%) – *Bio-Rad Laboratories*;
- Actinomicina D – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Agarose – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Albumina de Soro Bovino (BSA) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Álcool isoamílico – *Panreac Química S.A.*;
- Aminoácidos, mistura de – *BioWhittaker®*;
- Antibióticos, mistura de – *BioWhittaker®*;
- Azul de bromofenol – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Azul de metileno – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

#### C.

- Cicloheximida – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Citrato trissódico – *Merck*;
- Cloreto de sódio (NaCl) – *Panreac Química S.A.*;
- Clorofórmio – *VWR®*;
- Corante de Ponceau – *USB Corporation*;

#### D.

- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- DEANO (diethylamine NONOate) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

- DETA/NO (diethylenetriamine NONOate) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Digoxigenina-11-dUTP – *Roche*;
- Dihidrocloreto de N-1-naftiletilendiamina (NED) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) – *USB Corporation*;
- Ditiotreitól (DTT) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- DMSO (sulfóxido de dimetilo) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*.

**F.**

- Fenol – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Ficoll – *Pharmacia Biotech*;
- Fluoreto de fenilmetilsulfonil – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Fluoreto de sódio (NaF) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Formaldeído – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Formamida desionizada – *Fluka*;

**G.**

- Glicerol – *USB Corporation*;
- Glutaraldeído – *Panreac Química S.A.*;

**H.**

- Hidrogenofosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – *USB Corporation*;
- Hidróxido de sódio (NaOH) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**I.**

- Inibidores de proteases – *Roche*;
- Isopropanol – *Panreac Química S.A.*;

**K.**

- Kit DIG High Prim DNA Labeling and Detection – *Roche*;
- Kit de quimioluminescência SuperSignal<sup>®</sup> West Pico – *Pierce Biotechnology*

**L.**

- Leite magro – *Asturiana*;
- Líquidos revelador e fixador Kodak G.B.X – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**M.**

- Marcador de pesos moleculares “Precision Plus Protein Standards” – *Bio-Rad Laboratories*;

- Meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Mercaptoetanol,  $\beta$ -mercaptoetanol – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) – *Panreac Química S.A.*;
- MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**N.**

- Nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**O.**

- Ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**P.**

- Paraformaldeído – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Persulfato de amônio (APS) – *Bio-Rad Laboratories*;
- Pirofosfato de sódio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) – *Panreac Química S.A.*;
- Poli-D-lisina – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- Polivinilpirrolidona – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**R.**

- Reagente de Bradford – *Bio-Rad Laboratories*;

**S.**

- Sacarose – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- SLS (Sodium Lauryl Sarcosine) – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;
- SIN-1 (5-amino-3-(4-mopholiny)-1,2,3-oxidiazolium chloride) – *Cayman Chemical Company*;
- Sulfanilamida – *Sigma-Aldrich Chemical Corporation*;

**T.**

- Tetrametiletenodiamina (TEMED) – *Bio-Rad Laboratories*;
- Tiociantao de guanidina – *Fluka*;
- Tris-Base – *Calbiochem*;
- Triton X-100 – *Bio-Rad Laboratories*.

## 4. Procedimento

### 4.1. Cultura da linha celular SH-SY5Y e tratamentos

A linha celular de neuroblastomas humanos SH-SY5Y foi cultivada em frascos de cultivo com 75cm<sup>2</sup> em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) suplementado com 15% (v/v) de FBS (soro fetal bovino), 1% (v/v) de glutamina 2mM, 1% (v/v) de mistura de antibióticos, nomeadamente penicilina e estreptomicina e 1% (v/v) de mistura de aminoácidos, sendo mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após confluência, as células foram passadas para placas de cultivo numa densidade de aproximadamente 70000células/cm<sup>2</sup> que foram mantidas igualmente a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h previamente à realização das experiências. Passadas 24h o meio foi substituído por meio sem soro e as células tratadas com diferentes concentrações de doadores de óxido nítrico – DEANO (diethylamine NONOate), DETA/NO (diethylenetriamine NONOate) e SIN-1 (5-amino-3-(4-mopholiny)-1,2,3-oxidiazolium chloride) – ou com uma concentração fixa destes durante diferentes períodos de tempo, ou isentos destes como controlo. De referir ainda que estas experiências foram realizadas na presença ou ausência de inibidores de síntese proteica, cicloheximida ou actinomicina D.

### 4.2. Medida da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) gerado pelos doadores de NO foi determinado indirectamente através da medição de nitritos formados, que é um metabolito estável do NO, pela reacção de Griess. Na reacção de Griess original, o nitrito reage com o ácido sulfanílico sob condições acídicas, para formar um ião diazónio que se liga à  $\alpha$ -naftilamina para originar um produto de cor púrpura/magenta facilmente solúvel em água. Contudo, o método de Griess normalmente usado apresenta algumas modificações relativamente à reacção de Griess original. Em vez dos reagentes originalmente usados, isto é, o ácido sulfanílico e  $\alpha$ -naftilamina, chamados reagentes Griess, podem usar-se derivados destes componentes nitrosáveis, notavelmente a sulfanilamida e *N*-(1-naftil)-etilenodiamina (NED), pois esta possui várias vantagens relativamente a outros componentes [50]. Assim, recolheu-se uma alíquota do meio da cultura celular, à qual se adicionou 1mM de NaOH (DETA/NO e DEANO) ou 0,1mM de HCl (SIN-1) numa razão de 9/1, para parar a libertação de NO. De seguida, a 1mL de meio adicionaram-se 50µL de uma solução constituída por 5% (m/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de ácido

fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Deixou-se a mistura à temperatura ambiente (TA) num local escuro durante 5 minutos e posteriormente adicionaram-se 250 $\mu\text{L}$  de outra solução aquosa constituída por 1% (m/v) de dihidroclorato de N-1-(naftil)-etilenodiamina (NED) incubando-se de novo 5 minutos à TA num local escuro. Procedeu-se à medida de absorvância de cada amostra, cuja leitura foi realizada a 540nm, sendo a quantificação de nitritos obtida com base numa recta padrão construída com diferentes concentrações conhecidas (num intervalo de 0-50 $\mu\text{M}$ ) de nitrito de sódio obtidas a partir de uma solução stock deste de 100mM.

### 4.3. Western Blotting

O *Western Blotting* é uma técnica que detecta a presença de uma proteína específica num extracto proteico [32]. Para tal é necessária uma electroforese num gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença de um agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol) de modo a separar proteínas de acordo com a sua massa molecular, sendo estas posteriormente imobilizadas. Esta imobilização é feita através da transferência destas proteínas para uma fase sólida, de modo a poder detectar e identificar imunologicamente a proteína de interesse [6]. Assim, a membrana para a qual se realiza a transferência é exposta a anticorpos específicos para uma proteína em particular e em seguida detectada a sua presença por quimioluminescência [32].

#### 4.3.1. Preparação dos extractos celulares

Para esta técnica as células foram cultivadas em placas com 60mm de diâmetro na densidade anteriormente indicada. Depois de cada experiência o meio foi recolhido juntamente com as células, sendo estas recolhidas em tampão PBS (*phosphate-buffered saline*) frio (pH7,5) e centrifugadas a 5000rpm durante 10 minutos, dispensando o sobrenadante. O tampão PBS é constituído por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,91mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,17mM e NaCl 15mM. O *pellet* foi lisado com o volume adequado de tampão de lise, sendo este constituído por 50mM de Tris-HCL pH7,5, 1mM de ácido etileno glicol-tetracético (EGTA), 1mM de ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA), 1mM de Ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 10mM de fluoreto de sódio (NaF), 5mM de pirofosfato de sódio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), 0,27M de sacarose, 0,1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1% (v/v) de Triton X-100, 0,1% (v/v) de mercaptoetanol e inibidores de proteases. Após 10 minutos em gelo, os lisados foram centrifugados a 13500rpm durante 5 minutos a 4°C recolhendo-se em seguida os sobrenadantes.

#### 4.3.2. Doseamento de proteínas

A quantificação de proteínas em cada amostra foi realizada pelo método de Bradford, que está desenhado para quantificar, essencialmente, 1 a 10µg de proteína [44] e demonstrou-se menos susceptível a interferências [3]. Este método depende da quantificação da ligação de um corante, *Coomassie brilliant blue*, a uma proteína desconhecida e comparar esta ligação a quantidades conhecidas de uma proteína padrão, normalmente BSA (Albumina de Soro Bovino) [44]. Para tal, a 18µL de água destilada adicionaram-se 2µL de amostra e de seguida 1mL do reagente de Bradford. Posteriormente leram-se as absorvâncias a 595nm, sendo a quantificação proteica obtida com base numa recta padrão construída com diferentes concentrações conhecidas (0, 2, 4, 6 8 e 10mg/mL) de BSA.

#### 4.3.3. Electroforese SDS-PAGE

Após a quantificação de proteínas resultantes da lise celular, estas foram então preparadas para serem separadas de acordo com a sua massa molecular por SDS-PAGE. Assim, num volume final de 200µL adicionaram-se as amostras de modo a que contivessem aproximadamente 10-20µg de proteína/10µL, ¼ de volume de tampão de electroforese (4x concentrado) e perfizeram-se os 200µL com tampão de lise, sendo de seguida desnaturadas a 95°C durante 5 minutos. Uma vez preparadas as amostras, separaram-se as proteínas por electroforese em géis desnaturantes de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE, 8 ou 10%) em aparelhos de acordo com as instruções do fabricante. Para prepara o gel de migração utilizou-se 8 ou 10% de acrilamida; tampão Tris 375mM (pH 8,8); 0,1% de SDS; 0,1% de persulfato de amónio (APS) e, respectivamente, 0,06 ou 0,04% de TEMED (Tetrametiletenodiamina). O gel de concentração foi preparado de igual modo que o de migração, no entanto com 5% de acrilamida, tampão Tris 125mM (pH 6,8) e 0,1% de TEMED. As amostras foram carregadas no gel de concentração, colocando o volume equivalente a aproximadamente 40µg de proteína por poço, bem como 5µL do marcador de pesos moleculares, e submetidas a uma voltagem de 200V durante 50 minutos.

#### 4.3.4. Transferência em semi-seco

Procedeu-se à transferência das proteínas do gel de migração para uma membrana de PVDF (*polyvinilidene difluoride*) recorrendo a um sistema Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry Transfer. Finalizada a electroforese o gel de migração foi colocado em SDB-

1 (*Semi-Dry Buffer*), constituída por ácido aminocaprílico 40mM, Tris-Base 25mM e 20% de metanol, e a membrana, previamente activada em metanol (5min), colocada em SDB-2, constituída por 25mM de Tris-Base e 20% de metanol. Procedeu-se em seguida à montagem da *sandwich* para a transferência, evitando a formação de bolhas, colocando, de baixo para cima, 2 pedaços de papel de Whatman embebidos em SDB-3, constituída por Tris-Base 300mM e 20% de metanol, 1 pedaço de papel de Whatman embebido em SDB-2, membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno), gel de migração e por fim 3 pedaços de papel de Whatman embebidos em SDB-1. A transferência decorreu à temperatura ambiente, durante 15 minutos a uma voltagem de 20V, tendo sido a sua eficiência visualizada pela coloração da membrana com vermelho Ponceau (0,1% de corante de Ponceau em 5% de ácido acético). Depois desta coloração a membrana foi lavada em PBS sob agitação para proceder à sua descoloração.

#### 4.3.5. Imunodeteção de proteínas

Prosseguiu-se com o bloqueio das membranas durante 1hora em agitação para evitar posteriores ligações inespecíficas dos anticorpos (Ac) à membrana. A solução de bloqueio é constituída por solução A (Tris 10mM e NaCl 150mM) pH7,5, 10% de leite magro e 0,5% de Tween 20. Uma vez bloqueada, a membrana foi então incubada com o anticorpo primário (Tabela 1) e de seguida lavada três vezes em intervalos de 5 minutos antes de incubar com o Ac secundário durante 45 minutos à temperatura ambiente (Tabela 2). Tanto o Ac primário como o secundário foram preparados numa solução semelhante à solução utilizada para o bloqueio mas com leite magro 5% e 0,05% de Tween 20. No fim da incubação do Ac secundário a membrana foi lavada de igual modo que depois da incubação com o Ac primário. Esta solução de lavagem é constituída por solução A e 0,05% de Tween 20.

**Tabela 1:** Anticorpos primários usados para o *Western blot* e condições de utilização.

Ac primário	Diluição	Incubação	Espécie imunizada	Companhia
<b>Tau</b>	1/1000 ou 1/500	Durante a noite, 4°C	Ovelha	<i>Obtenção própria</i>
<b>Actina</b>	1/2000	1h, TA	Coelho	<i>Sigma-Aldrich</i>



**Tabela 2:** Anticorpos secundários usados para o *Western blot*.

Ac secundário	Diluição	Companhia
Anti-ovelha	1/5000	Pierce
Anti-coelho	1/10000	Pierce

As bandas imunorreactivas foram visualizadas com o kit de quimioluminescência, fazendo uma diluição de 1:1 de cada um dos reagentes (luminol e reagente de oxidação) e incubando as membranas nesta mistura durante 5 minutos. De seguida colocaram-se as membranas numa cassete procedendo-se à exposição de filmes durante diferentes períodos de tempo na câmara escura, sendo estes de seguida revelados.

#### 4.4. Determinação da viabilidade celular

Para avaliar a sobrevivência celular recorreu-se ao método do MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um sal de tetrazólio que quando dissolvido se converte num composto insolúvel de cor púrpura, o *formazan*. Este resulta da quebra do anel tetrazólio efectuada por enzimas desidrogenases mitocondriais, e pode ser solubilizado usando isopropanol ou outros solventes e posteriormente medido por espectrofotometria. Assim, as enzimas presentes nas células vivas serão as responsáveis por esta conversão, portanto a leitura espectrofotométrica é proporcional à viabilidade celular [43]. As células foram cultivadas em placas com 35mm de diâmetro na densidade inicialmente indicada. Deste modo, aos cultivos celulares adicionaram-se 150µL de uma solução de MTT (5mg/ml em PBS) e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Após esta incubação, os cristais de *formazan*, resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos numa solução de HCL 0,06 N em isopropanol absoluto e a absorvância foi medida num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 570nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem relativamente à absorvância determinada nas células controlo.

#### 4.5. Northern Blotting

A técnica de *Northern Blotting* é uma técnica-chave em biologia molecular, cujo principal objectivo é medir um ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) específico. Esta baseia-se na separação dos RNA por tamanhos e a sua detecção numa membrana usando uma sonda de hibridação com uma sequência de bases complementares a toda, ou parte da sequência de mRNA alvo [49].

#### **4.5.1. Extração do RNA total pelo método de Chomczynski**

Nestas experiências as células foram cultivadas em placas de 60mm de diâmetro na densidade indicada. Depois de cada experiência o meio foi recolhido juntamente com as células, sendo estas recolhidas com tampão PBS frio e centrifugadas a 5000rpm durante 10 minutos dispensando o sobrenadante. O *pellet* foi lisado com uma solução constituída por 4M de tiocianato de guanidina, 25mM de citrato de sódio, 0,5% de SLS (*Sodium Lauryl Sarcosine*) e 0,1M de  $\beta$ -mercaptoetanol e seguidamente desprovido de proteínas utilizando uma mistura orgânica de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:25:1). O RNA presente na fase aquosa foi precipitado a -20°C durante toda a noite em presença de isopropanol (50%). Centrifugou-se a mistura anterior (13500rpm, 4°C, 15min), eliminou-se cuidadosamente o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 1mL de etanol (75%), eliminando completamente os restos de etanol por evaporação. Ressuspenderam-se os sedimentos de RNA em 30 $\mu$ L de água-DEPC (Dietilpirocarbonato) e de seguida mediu-se a concentração de RNA nas amostras e determinou-se a sua qualidade em gel de agarose 1%. Para determinar a concentração de RNA mediu-se a absorvância das amostras a 260nm. Para a análise a qualidade do RNA preparou-se um gel de agarose 1% em TBE (108gr de Tris, 55gr de ácido bórico, 40mL de EDTA (0,5M, pH8) e perfez-se 1L com água-DEPC, submetendo-o a uma voltagem de 80-100V durante cerca de uma hora. De seguida os RNAs foram visualizados em transiluminador de UV (ultravioleta).

#### **4.5.2. Separação do RNA, transferência e fixação deste desnaturalizado às membranas**

Os RNAs separaram-se por electroforese utilizando um gel de agarose 1% preparado em MOPS 10x concentrado (0,2M MOPS pH7, 20mM acetato de sódio e 10mM EDTA) e 5,5% de formaldeído (37%). Precipitaram-se 35 $\mu$ gr de RNA com etanol em presença de 300mM acetato de sódio e ressuspendeu-se o precipitado em 9 $\mu$ L de FA/FA (MOPS 1x, 6% de formaldeído, 50% de formamida desionizada e perfizeram-se 500 $\mu$ L com água-DEPC) e 1 $\mu$ L de tampão de electroforese (1mM de EDTA pH8, 50% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Seguiu-se com a desnaturalização das amostras a 68°C (15min) e em seguida colocaram-se 5 minutos em gelo e aplicaram-se no gel, que previamente se havia posto a correr 5 minutos antes (5V/cm), e submeteram-se a uma corrente de 100V durante tempo suficiente até atingir 10-14cm.

Finalizada a electroforese, o gel foi posto em agitação durante 10 minutos em água-DEPC, de modo a eliminar o formaldeído, e de seguida mais 30 minutos de agitação em SSC 20x (3M de NaCl, 320mM de citrato trissódico, pH7) autoclavado. Entretanto preparou-se uma membrana de nylon com o mesmo tamanho do gel e humedeceu-se em água-DEPC (5min) colocando-a depois em solução SSC 20x (15min). Para efectuar a transferência colocou-se o gel invertido no suporte, rodeando-o com parafilm com o cuidado de não o cobrir, e molhou-se com o tampão de transferência. Imediatamente acima deste colocaram-se pela seguinte ordem, a membrana de nylon, 3 folhas de papel de Whatman embebidos em SSC 20x, papel de *blotting* até atingir 5-8cm, uma placa de vidro e por fim um peso, deixando a transferência decorrer durante toda a noite. Decorrida a transferência colocou-se a membrana em agitação numa solução de SSC 6x a 23°C durante 5 minutos. Seguidamente secou-se a membrana num papel de filtro, colocando-a com o RNA voltado para cima e fixou-se expondo a membrana à luz UV durante 1minuto, sendo a eficiência da transferência visualizada pela coloração da membrana com azul de metileno (0,02% de azul de metileno em 0,3M de acetato de sódio pH 5,5). Procedeu-se à descoloração da membrana lavando-a numa solução de SSC 0,02x e 1% de SDS (15min).

#### 4.5.3. Hibridação em *Northern* e revelação imunológica

Bloqueou-se a membrana incubando-a sob agitação durante 30 minutos a 60°C numa solução de SSC 1x e 4% de SDS e de seguida procedeu-se à pré-hibridação. Para tal substituiu-se a solução anterior por 20mL solução de pré-hibridação constituída por SSC 4x, SDS 1x, 50% de formamida, 10x *Denhardt's*, cuja constituição inicial é 2% de ficoll, 2% de BSA e 2% de polivinilpirrolidona, e 100µg/mL DNA de esperma de salmão previamente desnaturado a 95°C (5min), e incubou-se durante 4h a 45°C. Finalizada a pré-hibridação, a membrana foi incubada durante toda a noite a 45°C com a solução de hibridação, de constituição igual à de pré-hibridação, mas adicionando-lhe a sonda de DNA de Tau previamente marcada e desnaturalizada a 95°C (5min). A sonda foi marcada pela técnica de “*random primed*” utilizando Digoxigenina-11-dUTP. No dia seguinte, a membrana foi lavada duas vezes com uma solução de SSC 2x e 1% de SDS, em agitação durante 10 minutos a 42°C, e três vezes com uma solução de SSC 0,1x e 0,1% de SDS também em agitação. Nestas, as duas primeiras lavagens decorreram a 42°C e uma última a 65°C, durante 10 minutos cada uma delas. Prosseguiu-se com a detecção imunológica do mRNA de Tau. Para tal a membrana foi

bloqueada com uma solução de 0,1M de ácido maléico pH7,5, 150mM de NaCl e reactivo de bloqueio 1x, durante 30 minutos. A membrana foi incubada durante 30 minutos numa solução igual à utilizada para o bloqueio mas contendo o anticorpo anti-digoxigenina-AP (1/5000). Lavou-se em seguida a membrana de modo a eliminar o excesso de Ac, duas vezes (10min) numa solução de 0,1M de ácido maléico pH7,5, 150mM de NaCl e 0,05% de Tween 20 e uma vez (5min) numa solução de Tris 0,1M (pH9,5) e NaCl 0,1M. A detecção foi efectuada utilizando o kit *DIG High Prim DNA Labeling and Detection*, incubando a membrana em 1mL deste reagente durante 15 minutos cobrindo-a com plástico. Decorrido esse tempo eliminou-se o excesso de reagente, colocando a membrana numa cassette de e procedeu-se à exposição de filmes de quimioluminescência numa câmara escura.

#### 4.6. Microscopia de Imunofluorescência

A microscopia de imunofluorescência, é talvez um dos melhores métodos utilizados para localizar proteínas numa célula usando um microscópio de fluorescência e anticorpos específicos para a proteína que se deseja localizar. Estes anticorpos estão quimicamente acoplados a corantes fluorescentes, normalmente rodamina que emite luz vermelha, ou fluoresceína que emite luz verde. A luz fluorescente emitida pela amostra quando iluminada com o comprimento de onda de excitação permite então formar uma imagem e visualizar a proteína marcada com o anticorpo acoplado à molécula fluorescente [32]. Previamente ao cultivo celular, depositou-se uma lamela no fundo de cada placa utilizada e trataram-se com poli-D-lisina (10mg/L), deixando incubar com esta pelo menos 4h, de modo a potenciar a aderência das células. As células foram então cultivadas em placas com 20mm de diâmetro na densidade inicialmente indicada e tratadas durante 3 dias com ácido retinóico 10 $\mu$ M. Posteriormente a este tratamento as células foram então submetidas ao tratamento referido inicialmente durante 24h. Após este tratamento as células foram fixadas durante 20 minutos com 4% de paraformaldeído, no caso da incubação com anticorpo de neurofilamentos, ou 2,5% de paraformaldeído com 0,1% de glutaraldeído em PBS, no caso da incubação com anticorpo de tau. Depois de fixadas as células, estas foram lavadas duas vezes com PBS e de seguida incubadas com anticorpo primário (Tabela 3) durante a noite a 4°C. Prosseguiu-se com a incubação do anticorpo secundário (Tabela 4) durante 2 horas à TA num local escuro. Passado esse tempo as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 1 $\mu$ M de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 30 minutos à

TA num local escuro e em seguida procedeu-se à montagem das lamelas. Para tal aplicaram-se nas lâminas 3 $\mu$ L de meio de montagem, constituído por glicerol-PBS numa relação de 1:1, colocando cada uma das lamelas invertidas (com as células voltadas para baixo) sobre cada uma das gotas, selando a preparação anterior com verniz. As preparações anteriores foram visualizadas ao microscópio de fluorescência.

**Tabela 3:** Anticorpos primários usados para imunofluorescência.

<b>Ac secundário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Espécie imunizada</b>	<b>Companhia</b>
<b>Tau</b>	1/100	Ovelha	<i>Obtenção própria</i>
<b>Neurofilamentos</b>	1/100	Rato	<i>Sigma-Aldrich</i>

**Tabela 4:** Anticorpos secundários usados para imunofluorescência.

<b>Ac secundário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Companhia</b>
<b>Anti-sheep Alexa 594</b>	1/100	<i>Molecular Probes</i>
<b>Anti-mouse Cy<sup>TM</sup>3-conjugated</b>	1/100	<i>Jackson ImmunoResearch Laboratories</i>

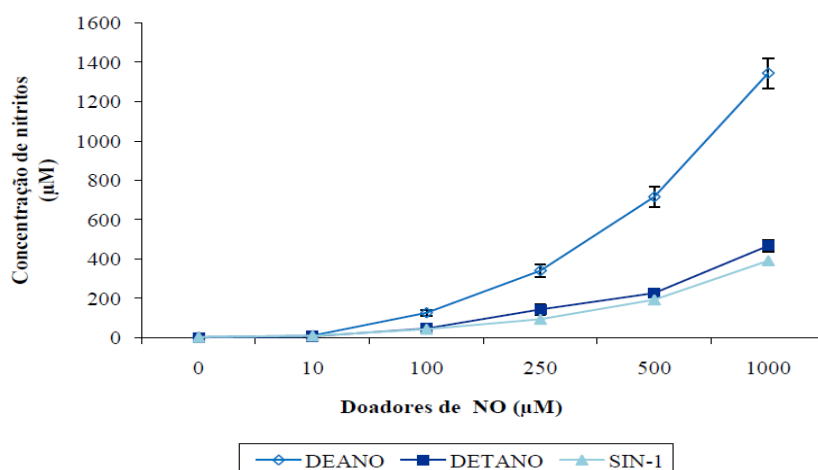
#### 4.7. Análise Estatística

Os dados são expressos pela média dos resultados obtidos  $\pm$  erro padrão, em pelo menos três experiências e foram analisados estatisticamente mediante o teste *t* de Student, considerando significativa uma probabilidade de mais de 95%, isto é,  $p < 0,05$ .

## *IV - Resultados*

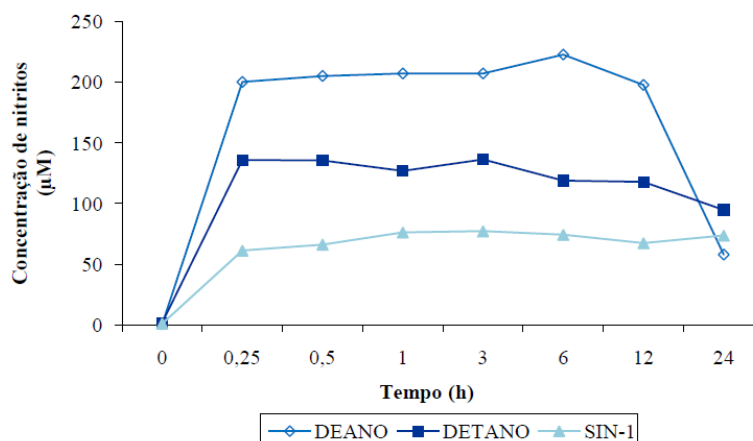
## 1. Quantificação do NO libertado

De modo a confirmar a libertação de NO pelos doadores de NO (DEANO, DETA/NO e SIN-1) após a sua incubação, efectuou-se a sua medição indirecta através da medição de nitritos pelo método de Griess nos sobrenadantes recolhidos das culturas celulares de neuroblastomas tratados com diferentes concentrações de DEANO, DETA/NO e SIN-1, isto é, 10, 100, 250, 500  $\mu$ M e 1mM. Estas concentrações foram preparadas em meio de cultura DMEM/F12 a partir de um stock de 100mM preparado em 10mM de NaOH no caso de DEANO e DETA/NO, e de 10mM preparado em DMSO (sulfóxido de dimetilo) no caso do SIN-1. Tal como seria de esperar, confirmou-se então que os doadores de NO libertavam NO de modo proporcional a cada uma das concentrações utilizadas no tratamento das culturas celulares (Figura 8).



**Figura 8:** Quantidade de nitritos libertada por diferentes concentrações de DEANO ( $\diamond$ ), DETA/NO ( $\blacksquare$ ) e SIN-1 ( $\blacktriangle$ ) em 24h, sob as condições experimentais em DMEM/F12. A dissociação do DEANO e DETA/NO foi parada após a recolha das amostras com NaOH e do SIN-1 com HCl. Os níveis de nitritos foram determinados pelo método de Griess como descrito nos “Materiais e Métodos”, sendo os dados ( $\pm$  erro padrão) de cinco experiências com determinações em triplicado.

Também para poder obter uma estimativa da evolução no tempo da dissociação dos doadores de NO sob as condições experimentais utilizadas recorreu-se mais uma vez ao método de Griess descrito anteriormente no procedimento. Assim, realizou-se a medição de nitritos libertados por 250  $\mu$ M de doadores de NO em cultura durante vários períodos de tempo, nomeadamente às 0, 0,25; 0,5; 1; 3; 6; 12 e 24h após a sua incubação, cujos resultados se encontram explícitos na figura 9. Pode observa-se que todos os doadores apresentam um padrão semelhante de libertação de NO atingindo prontamente, cerca dos 15 minutos, o pico da sua libertação embora em concentrações bastante diferentes.



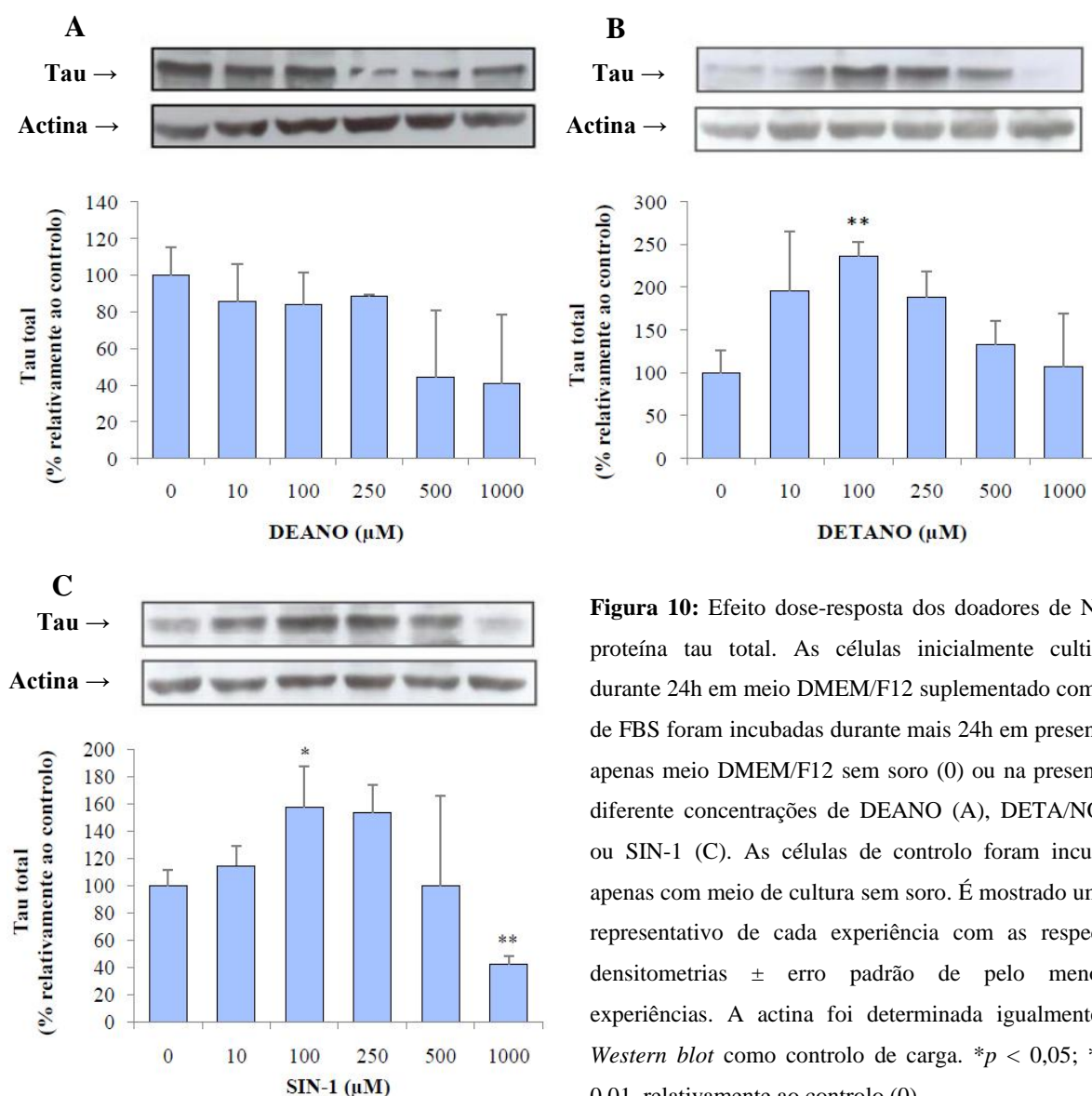
**Figura 9:** Evolução no tempo da formação de nitritos. A formação de nitritos foi medida após adição de 250µM de doadores de NO às culturas celulares em DMEM/F12, mostrando a taxa de NO no caso do DEANO (◇) e DETA/NO (■) e de ONOO<sup>-</sup> no caso do SIN-1 (▲). A dissociação do DEANO e DETA/NO foi parada após a sua recolha com NaOH e do SIN-1 com HCl. Os níveis de nitritos foram determinados pelo método de Griess como descrito nos “Materiais e Métodos”, sendo os dados (± erro padrão) de duas experiências com determinações em duplicado.

O DEANO produz a maior concentração de NO libertado/250µM de doador (15min). Nos tempos seguintes a sua concentração mantém-se constante e a partir das 12h decresce bruscamente. Relativamente ao DETA/NO e SIN-1, estes dois doadores atingem um pico de libertação imediato, logo aos 15 minutos semelhantemente ao que acontece com o DEANO.

## 2. Efeito dos doadores de óxido nítrico na proteína tau:

Para visualizar o efeito que os doadores de NO referidos exercem sobre a proteína tau, recorreu-se à linha celular de neuroblastomas humanos SH-SY5Y. O primeiro passo para esta análise foi determinar a expressão desta proteína total de um modo dependente da dose dos doadores de NO, DEANO, DETA/NO e SIN-1. Os dois primeiros dão origem a NO enquanto o SIN-1 origina de igual modo NO e superóxidos, originando ONOO<sup>-</sup> [38]. Assim, as células foram tratadas com diversas concentrações de doadores de NO, nomeadamente 10, 100, 250, 500µM e 1mM, preparadas igualmente a partir de um stock de 100mM preparado em 10mM de NaOH no caso de DEANO e DETA/NO, e de 10mM preparado em DMSO no caso do SIN-1. Passadas 24h deste tratamento procedeu-se à medição de proteínas para em seguida proceder então à detecção da proteína tau por *Western blot* (Figura 10).



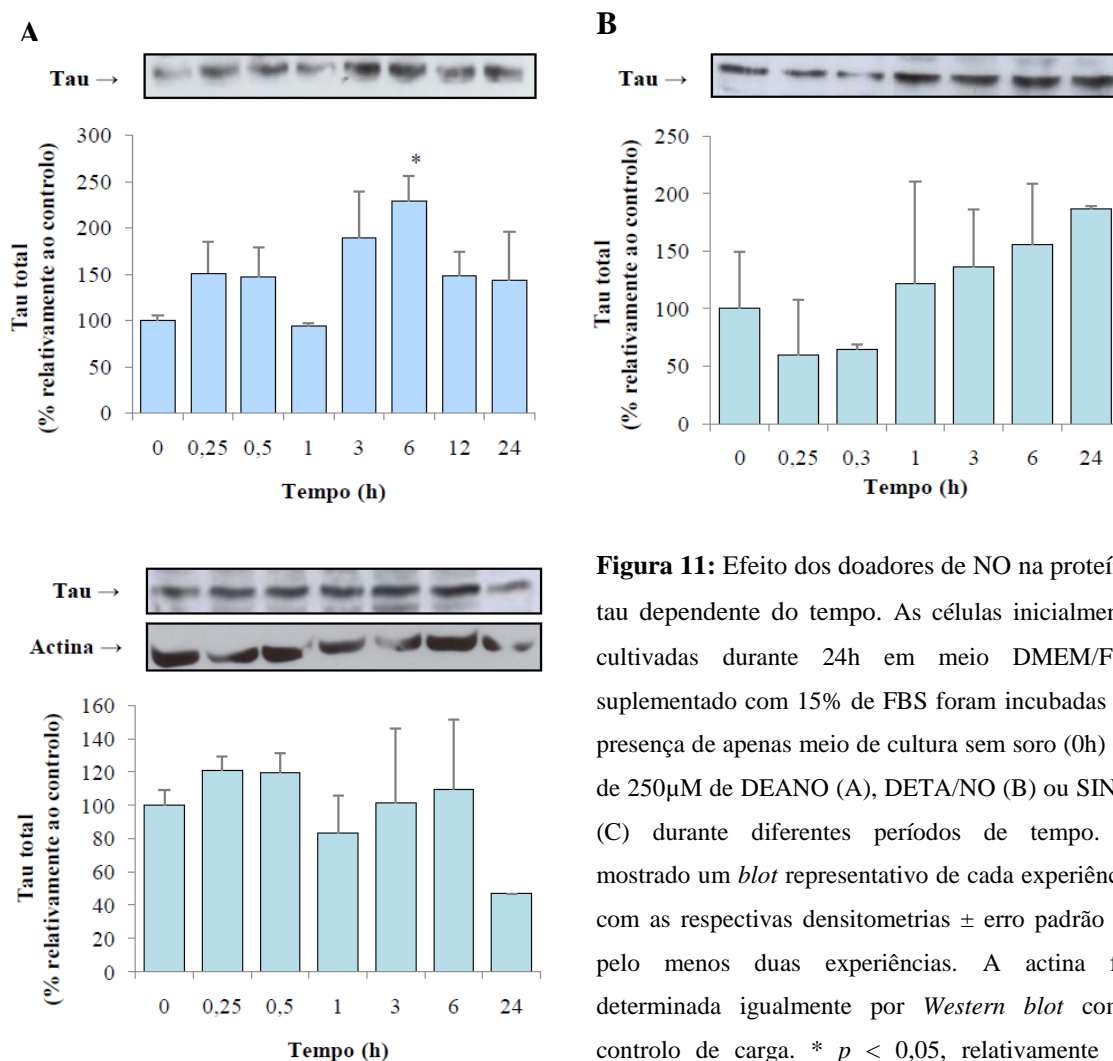


**Figura 10:** Efeito dose-resposta dos doadores de NO na proteína tau total. As células inicialmente cultivadas durante 24h em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de FBS foram incubadas durante mais 24h em presença de apenas meio DMEM/F12 sem soro (0) ou na presença de diferentes concentrações de DEANO (A), DETANO (B) ou SIN-1 (C). As células de controlo foram incubadas apenas com meio de cultura sem soro. É mostrado um *blot* representativo de cada experiência com as respectivas densitometrias  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 experiências. A actina foi determinada igualmente por *Western blot* como controlo de carga. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , relativamente ao controlo (0).

Na imagem respeitante ao DETANO e SIN-1 observa-se um aumento de tau proporcional à concentração de doador aplicada até à concentração de 100μM inclusivamente, e posteriormente uma diminuição bastante acentuada, sendo que na presença de 1μM do doador SIN-1 a presença de tau é muito baixa. Por outro lado, no caso do DEANO esse aumento não é visível, havendo até uma ligeira diminuição até à concentração de 250μM e a partir daí uma diminuição muito mais acentuada, para menos de metade comparando com o controlo, embora não estatisticamente significativa.

Conjuntamente, efectuaram-se experiências de tempo-resposta com o intuito de observar as variações da proteína tau no tempo com a aplicação dos doadores de NO. Para tal, a linha celular SH-SY5Y foi tratada com 250μM de doadores de NO durante vários períodos de tempo (0h, 15 minutos, 30 minutos, 1h, 3h, 6h, 12h e/ou 24h). Após

cada um destes tempos as células foram recolhidas, medindo-se a quantidade de proteína existente em cada amostra e de seguida detectou-se a proteína tau por *Western blot* (Figura 11).



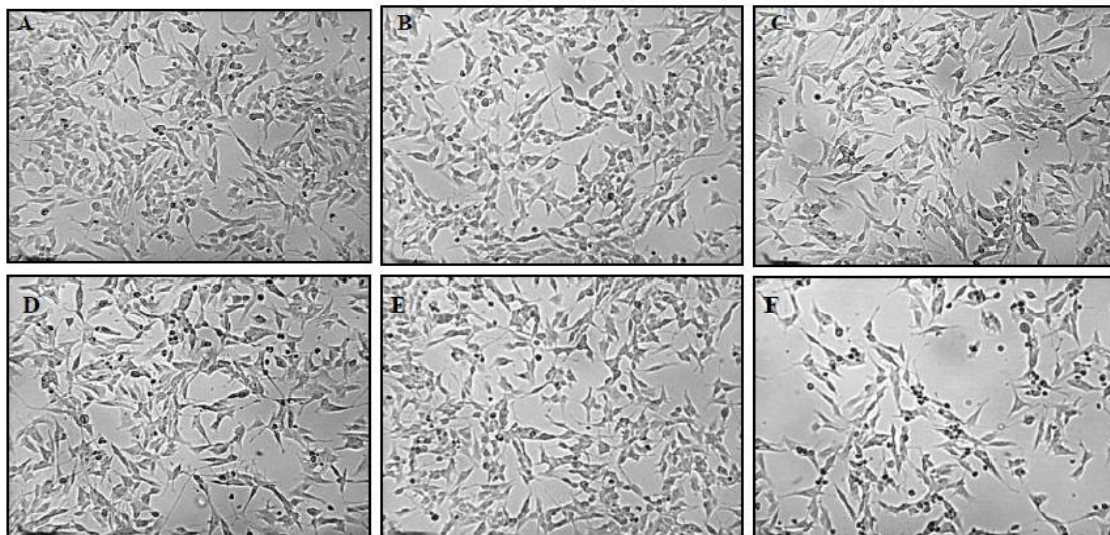
**Figura 11:** Efeito dos doadores de NO na proteína tau dependente do tempo. As células inicialmente cultivadas durante 24h em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de FBS foram incubadas na presença de apenas meio de cultura sem soro (0h) ou de 250μM de DEANO (A), DETA/NO (B) ou SIN-1 (C) durante diferentes períodos de tempo. É mostrado um *blot* representativo de cada experiência com as respectivas densitometrias ± erro padrão de pelo menos duas experiências. A actina foi determinada igualmente por *Western blot* como controlo de carga. \*  $p < 0,05$ , relativamente ao controlo (0).

Na figura 11 podem então ver-se as variações da proteína de um modo dependente do tempo. No tratamento das células com DEANO observa-se, aos 15 e 30 minutos um aumento de tau, que diminui em seguida à 1h de tratamento. Posteriormente, às 3h e 6h o nível de tau volta a aumentar, sendo que às 6h se observa o maior aumento desta proteína, seguindo-se nas horas posteriores uma ligeira diminuição. Ao submeter os neuroblastomas ao tratamento com DETA/NO verifica-se inicialmente (15 e 30min) uma diminuição de tau, seguindo-se, a partir da 1h um aumento gradual da quantidade de proteína tau detectada. Quanto ao tratamento com SIN-1 não se registam variações significativas do nível de tau detectado, à excepção de que à 1 e 24h se observa uma diminuição.

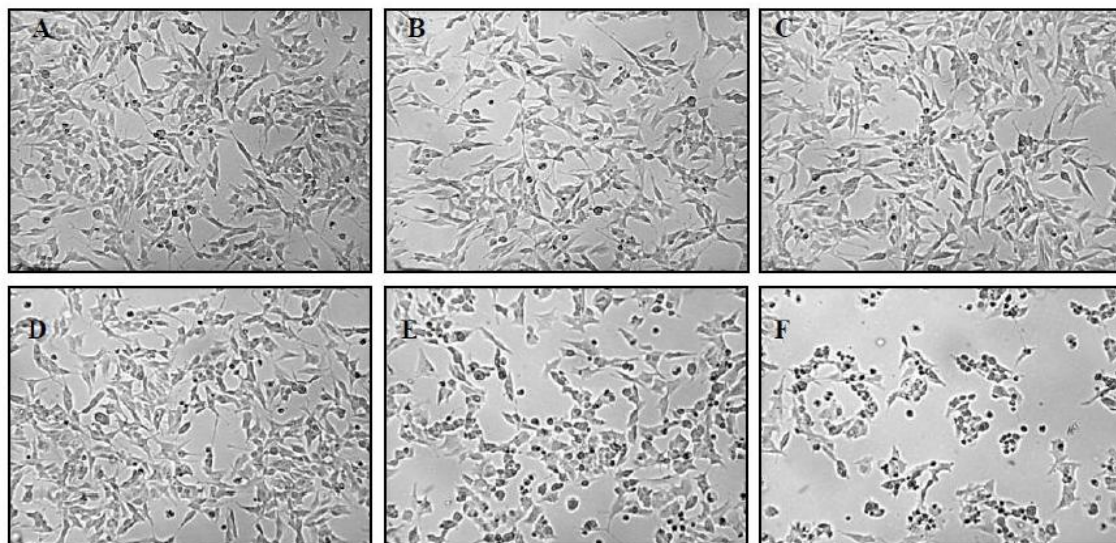
### 3. Efeito dos doadores de NO na viabilidade das células SH-SY5Y

Seguidamente à avaliação do efeito dos doadores de NO sobre as células SH-SY5Y foram efectuadas experiências para observar a viabilidade e, paralelamente a sua morfologia celular. Deste modo, nas experiências realizadas, os neuroblastomas foram tratados de igual modo como para a extracção proteica para análise por *Western blot*, ou seja, após 24h do seu cultivo mudaram-se os meios a meios sem soro com diferentes concentrações de doadores de NO (10, 100, 250, 500 $\mu$ M e 1mM) ou isentos destes como controlo. Passadas 24h deste tratamento as células foram observadas no microscópio invertido com um aumento de 10X e fotografadas (Figura 12). Em seguida mediu-se a sua viabilidade pelo método do MTT como descrito em “Materiais e métodos”, cujos resultados se encontram discriminados em percentagem de viabilidade relativamente ao controlo na figura 13.

1.

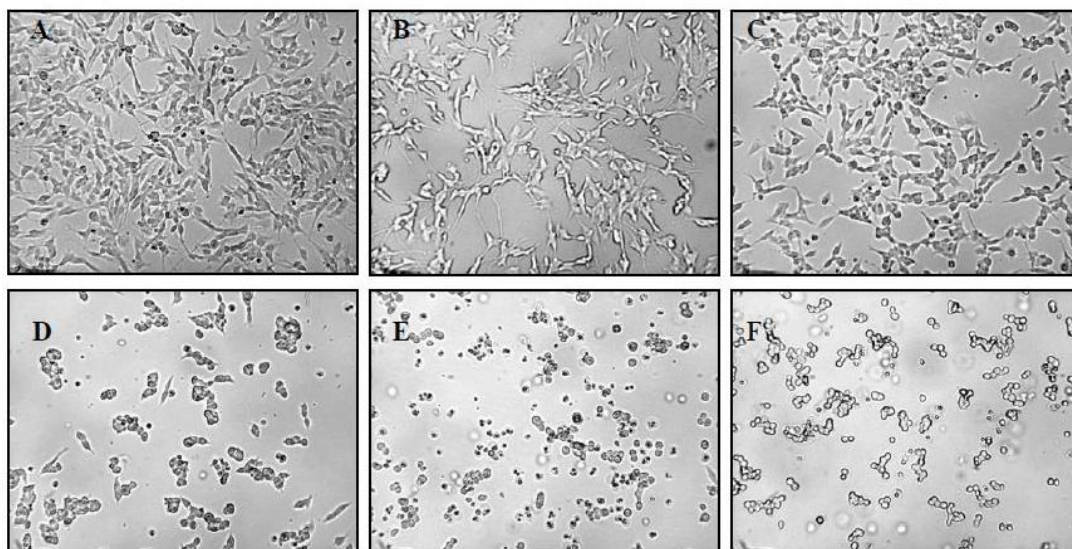


2.

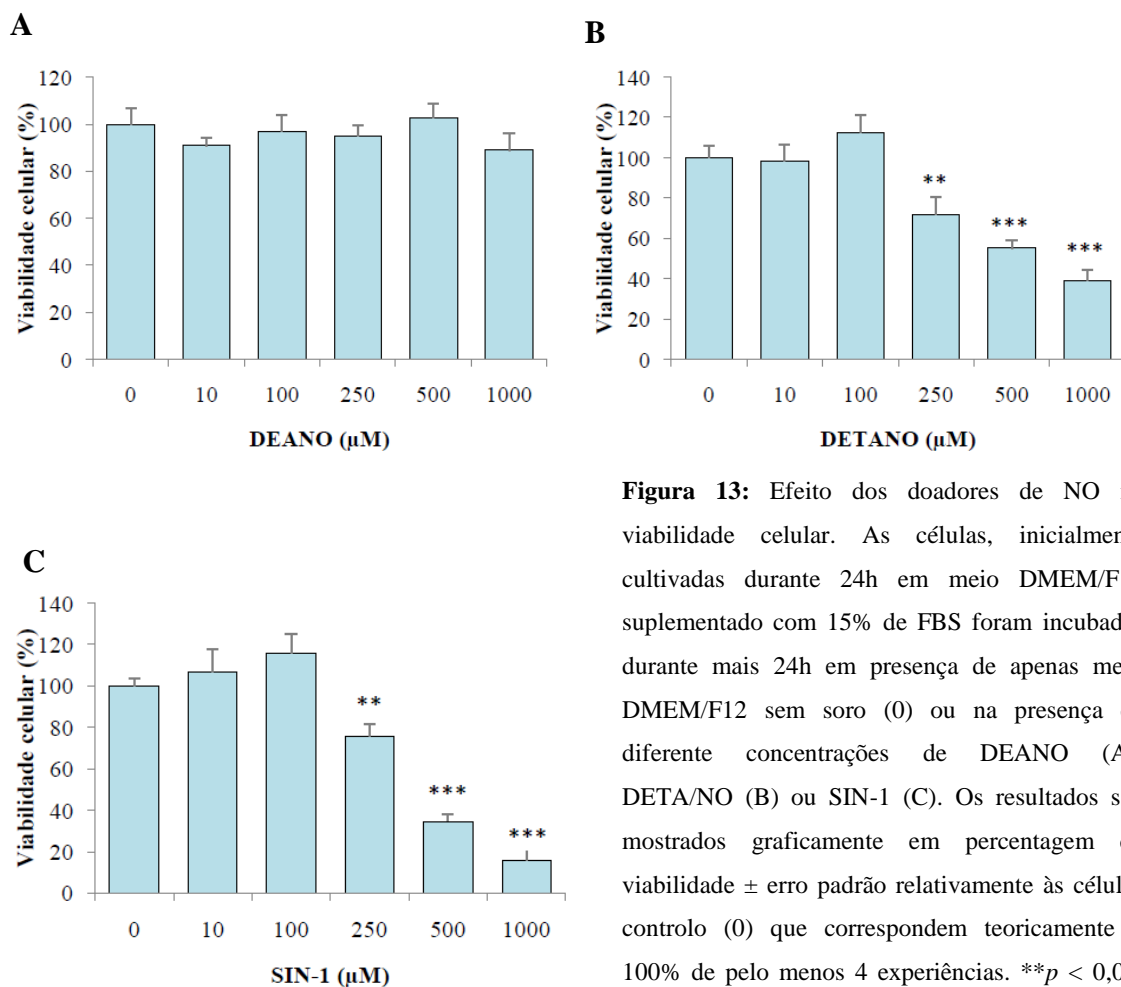




## 3.



**Figura 12:** Morfologia das células SH-SY5Y tratadas com DEANO (1), DETA/NO (2) ou SIN-1 (3). Os neuroblastomas, primeiramente cultivados em meio DMEM/F12 durante 24h, foram em seguida submetidos a tratamentos com os doadores de NO referidos em meio sem soro ou colocando-lhes apenas meio sem soro como controlo. Os neuroblastomas sem tratamento (A), com concentrações de doadores de NO de 10 $\mu$ M (B), 100  $\mu$ M (C), 250  $\mu$ M (D), 500  $\mu$ M (E) e 1mM (F) foram observados a microscópio com uma ampliação de 10X.



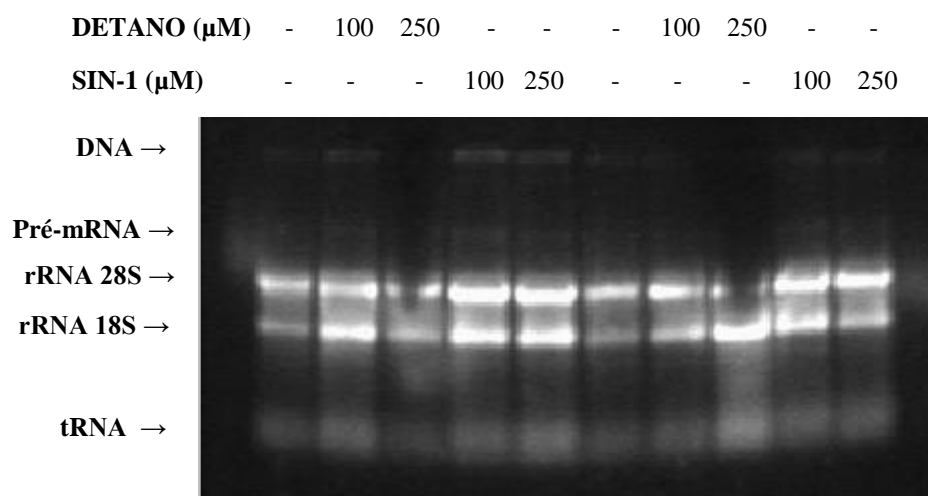
**Figura 13:** Efeito dos doadores de NO na viabilidade celular. As células, inicialmente cultivadas durante 24h em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de FBS foram incubadas durante mais 24h em presença de apenas meio DMEM/F12 sem soro (0) ou na presença de diferentes concentrações de DEANO (A), DETA/NO (B) ou SIN-1 (C). Os resultados são mostrados graficamente em percentagem de viabilidade  $\pm$  erro padrão relativamente às células controlo (0) que correspondem teoricamente a 100% de pelo menos 4 experiências. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , relativamente ao controlo (0).

Na figura 12 observa-se que as células apresentam comportamentos diferentes dependendo do doador de NO aplicado. Assim, com o tratamento com DEANO (1) em 24h as células conseguiram diferenciar-se não se visualizando demasiada morte celular nas diferentes concentrações aplicadas. Apenas na concentração de DEANO mais elevada, isto é, 1mM (Figura 12.1.F) se verifica nitidamente que existe um menor número de células bem como se denota um retraimento dos prolongamentos neuronais. Estes resultados estão totalmente de acordo com o gráfico de DEANO da viabilidade celular (Figura 13) no qual se verifica que a viabilidade não varia muito com as diferentes concentrações deste doador de NO utilizadas. No que respeita ao tratamento com DETA/NO, na figura 12 (2), já é possível observar um aumento de morte celular, e por conseguinte uma diminuição do número de células viáveis, designadamente com as concentrações de 250 (D), 500 $\mu$ M (E) e 1mM (F) relativamente ao controlo. Por outro lado, no tratamento com baixas concentrações (10 e 100 $\mu$ M) o efeito na morte e viabilidade das células praticamente não sofre alterações (Figura 13.B). Visualiza-se também uma menor diferenciação celular das células viáveis, apresentando estas menos dendrites e axónios ou apresentando-os com um tamanho mais pequeno. Aquando a medição da viabilidade celular destas placas foi de facto possível confirmar uma diminuição de células viáveis nas concentrações referidas, reduzindo as células a sua viabilidade em aproximadamente 50%, principalmente quando tratadas com 1mM de DETA/NO. Quanto ao tratamento com SIN-1 na figura 12 (3) é bem visível o aumento da morte celular, evidenciado pelo arredondamento dos neuroblastomas, de modo proporcional à concentração de SIN-1 aplicada nas células bem como uma menor diferenciação celular denotando-se os axónios e as dendrites muito menos desenvolvidos em comparação com as células controlo (0 $\mu$ M) onde todos os neurónios estavam bem diferenciados emitindo longos prolongamentos. Na concentração de 1mM praticamente já não existem células viáveis, estando já em suspensão no meio como se pode observar na figura 13.3.F., pelo que apresentam um aspecto translúcido. Analisando o gráfico respeitante à viabilidade celular de SIN-1 é possível confirmar esta diminuição de células viáveis.

#### **4. Análise do mRNA de tau por *Northern Blot***

Uma vez que se observou um aumento de proteína tau, averiguou-se a origem deste aumento. Normalmente, quando se observa um aumento da quantidade de uma qualquer proteína pode ser devido a um aumento de expressão transcricional,

traducional ou a uma diminuição da sua degradação. De modo a analisar se este aumento de tau é a nível transcrricional efectuaram-se experiências para análise de mRNA de tau aplicando o mesmo tratamento anterior, isto é, trataram-se as células com diferentes concentrações (100 e 250 $\mu$ M) de DETA/NO e SIN-1 ou sem qualquer doador como controlo. Decorridas 24h destes tratamentos as células foram recolhidas e o seu RNA isolado e devidamente separado (Figura 14) como descrito no procedimento para posterior detecção do mRNA de tau por *Northern blot*. Esta separação electroforética realizou-se como confirmação de uma extracção eficaz do RNA dos neuroblastomas.



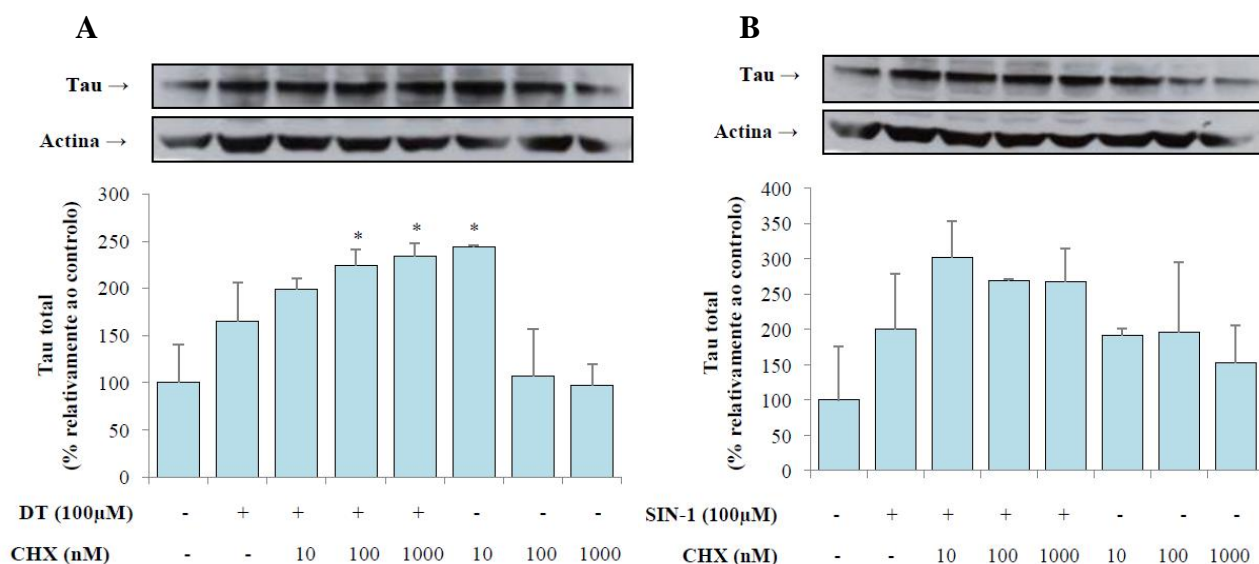
**Figura 14:** Separação electroforética do RNA extraído das células SH-SY5Y. As células, previamente cultivadas durante 24h em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de FBS, foram tratadas com 100 e 250 $\mu$ M de DETA/NO e SIN-1 em meio de cultivo sem soro ou apenas em meio de cultivo sem soro como controlo por mais 24h. Após essas 24h procedeu-se à extracção do seu RNA e tratou-se como descrito no procedimento. Esta electroforese foi realizada para confirmação da presença do RNA.

Como se pode observar pela figura 14 a extracção do RNA foi bem sucedida, permitindo que se prosseguisse com o procedimento descrito para a detecção do mRNA da proteína tau. Contudo, a sua detecção por *Northern blot* não foi bem sucedida não tendo sido possível a detecção final do mRNA da proteína tau.

## 5. Estudo do aumento do nível de proteína tau

Dado que não foi possível detectar o mRNA da proteína tau realizaram-se experiências alternativas para verificar a hipótese colocada de que o aumento de quantidades de tau visualizado por *Western blot* tinha a sua origem a nível de expressão. Estas experiências consistiram em, para além dos doadores de NO, adicionar químicos que interferem na expressão proteica, a cicloheximida (CHX) e a actinomicina D (Act

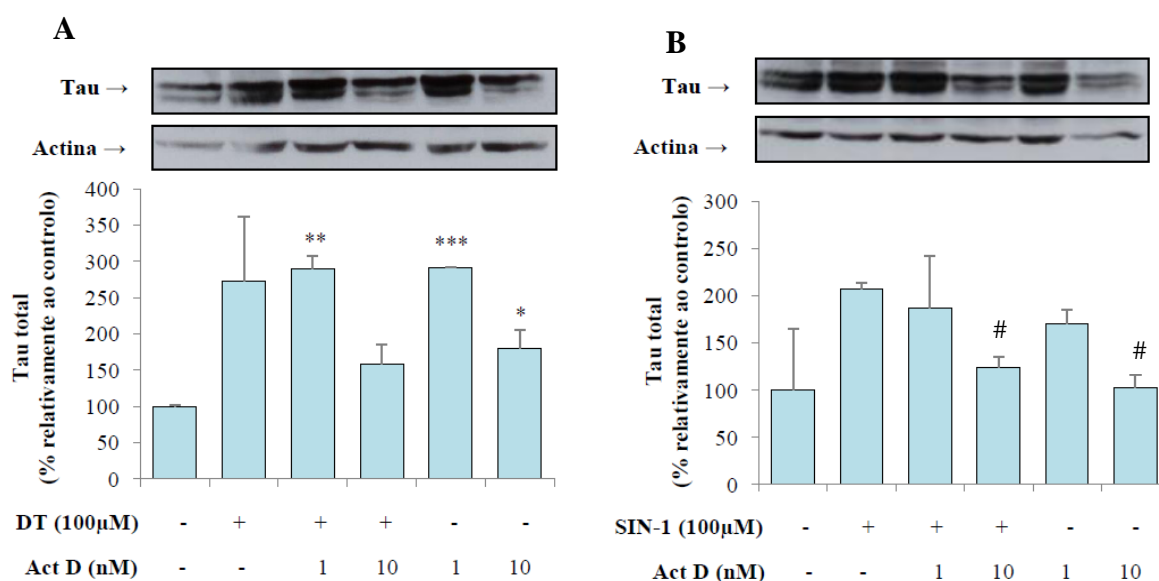
D). As células SH-SY5Y foram então tratadas com 100 $\mu$ M de DETANO e SIN-1, concentração onde se visualiza um pico da quantidade de tau detectada nas experiências de dose-resposta (Figura 10), na presença de diferentes concentrações de cicloheximida (10nM, 100nM e 1 $\mu$ M) ou de actinomicina D (1nM e 10nM) adicionadas 1h antes dos doadores de NO. Como controlo trataram-se as células apenas com os inibidores da síntese de proteínas, com iguais concentrações acima referidas, ou sem qualquer químico, isto é, apenas com meio de cultivo sem soro. Estes tratamentos foram igualmente aplicados durante 24h e passado este tempo as células foram recolhidas para posterior análise por *Western blot* (Figura 15 (A) e (B) e Figura 16 (A) e (B), respectivamente).



**Figura 15:** Efeito dos doadores de NO na proteína tau na presença ou ausência de cicloheximida. Os neuroblastomas foram inicialmente cultivados como descrito na figura 10 e em seguida incubadas durante mais 24h em presença de apenas meio DMEM/F12, na presença de 100 $\mu$ M de DETA/NO (DT, A) ou SIN-1 (B) e/ou na presença de diferentes concentrações de cicloheximida (CXH), sendo que pelo menos 1h antes do tratamento com os doadores de NO eram tratados com CHX. As células de controlo foram incubadas apenas com meio de cultura sem soro. É mostrado um *blot* representativo de cada experiência com as respectivas densitometrias  $\pm$  erro padrão de pelo menos duas experiências. A actina foi determinada igualmente por *Western blot* como controlo de carga. \* $p < 0,05$ , relativamente ao controlo.

Na figura 15, relativamente ao DETA/NO (A) observa-se que ao tratar as células com 100 $\mu$ M há uma aumento de proteína tau quando comparado com o controlo, tal como visto anteriormente (Figura 10). Ao tratar as células com cicloheximida adicionalmente a esta concentração de DETA/NO (100 $\mu$ M), comparando com o que

acontece com o tratamento apenas com DETA/NO visualiza-se um aumento ligeiro e gradual da proteína tau. Contudo, este aumento não é estatisticamente significativo relativamente ao tratamento com apenas DETA/NO. Nos tratamentos com apenas cicloheximida, observa-se que na concentração menor (10nM) há um aumento do nível de tau, comparativamente quer ao controlo quer ao tratamento com 100µM de DETA/NO, embora neste último caso não seja significativo a nível estatístico. Por outro lado, nos tratamentos com 100 e 1000nM de cicloheximida o nível de tau detectado é semelhante ao do controlo, mas encontra-se diminuído comparando com o tratamento com DETA/NO. Relativamente ao SIN-1 (B), confirma-se também a ocorrência de um aumento de tau apenas em presença deste doador de NO. Nos restantes tratamentos, isto é, nos tratamentos com o inibidor em presença ou ausência de SIN-1 não se verificam variações significativas, apesar de que no *blot* seja visível uma diminuição de tau quando em presença apenas de cicloheximida.



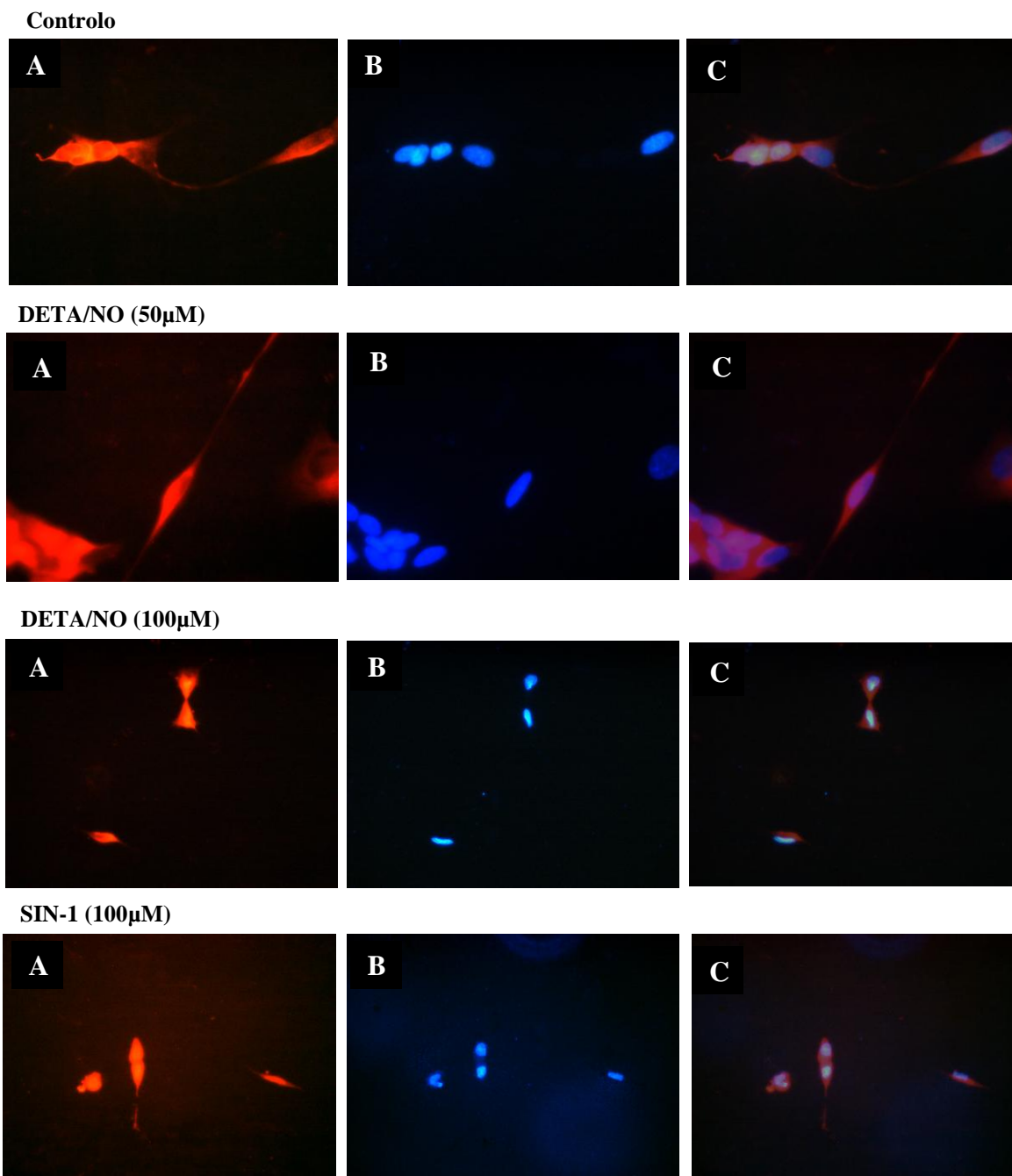
**Figura 16:** Efeito dos doadores de NO na proteína tau na presença ou ausência de actinomicina D. Os neuroblastomas foram inicialmente cultivados como descrito na figura 10 e em seguida incubadas durante mais 24h em presença de apenas meio DMEM/F12, na presença de 100µM de DETANO (A) ou SIN-1 (B) e/ou na presença de diferentes concentrações de Act D, sendo que pelo menos 1h antes do tratamento com os doadores de NO, as células eram tratadas com Act D. As células de controlo foram incubadas apenas com meio de cultura. É mostrado um *blot* representativo de cada experiência com as respectivas densitometrias  $\pm$  erro padrão de pelo menos duas experiências. A actina foi determinada igualmente por *Western blot* como controlo de carga. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , relativamente ao controlo. # $p < 0,05$ , relativamente ao tratamento somente com SIN-1.



Estudou-se ainda se os doadores de NO poderiam interferir nos mecanismos de transcrição da proteína tau devendo-se a estes o seu aumento, recorrendo para tal à utilização de um inibidor de transcrição, a actinomicina D. Tendo em conta a figura 16 pode ver-se nitidamente que os *blots* relativos ao tratamento com os doadores de NO em conjunto com o inibidor, ou apenas com a actinomicina D apresentam um padrão idêntico. De facto, pode comprovar-se pelos gráficos das densitometrias que os valores são idênticos na presença ou ausência de doador de NO aquando do tratamento com o inibidor.

## **6. Estudo da localização de proteínas de transporte neuronal por imunofluorescência**

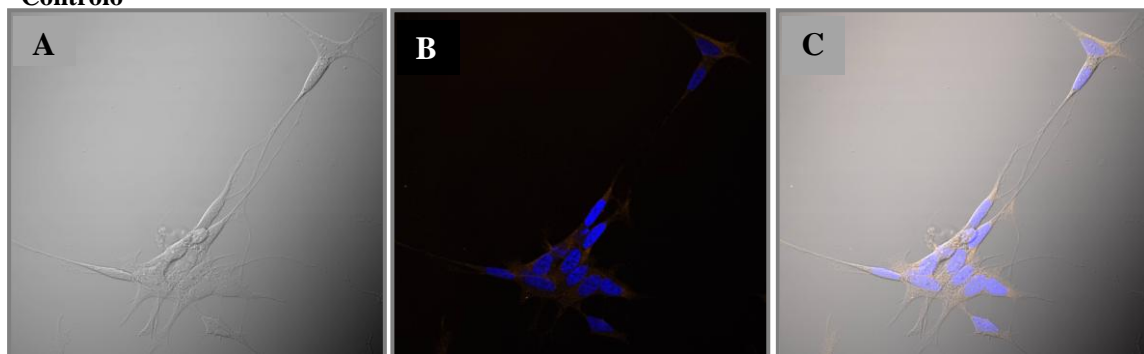
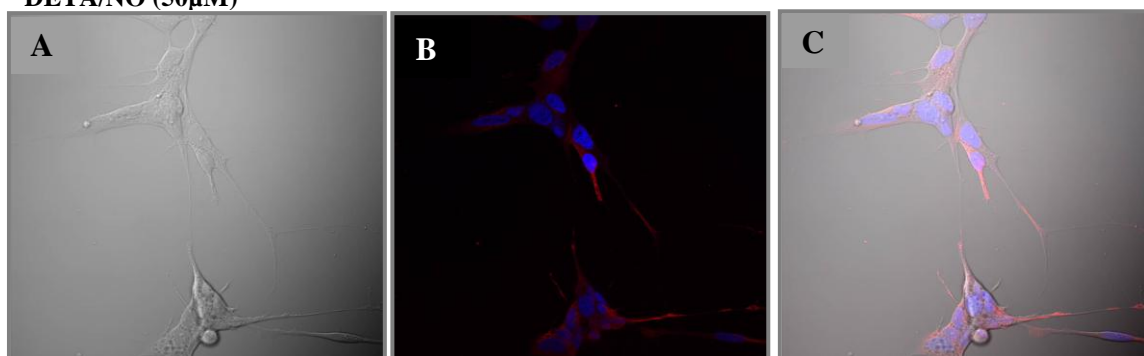
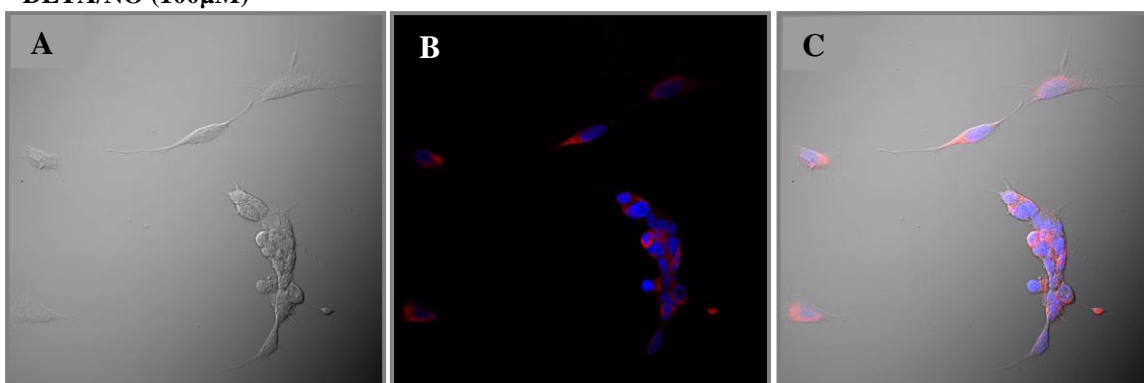
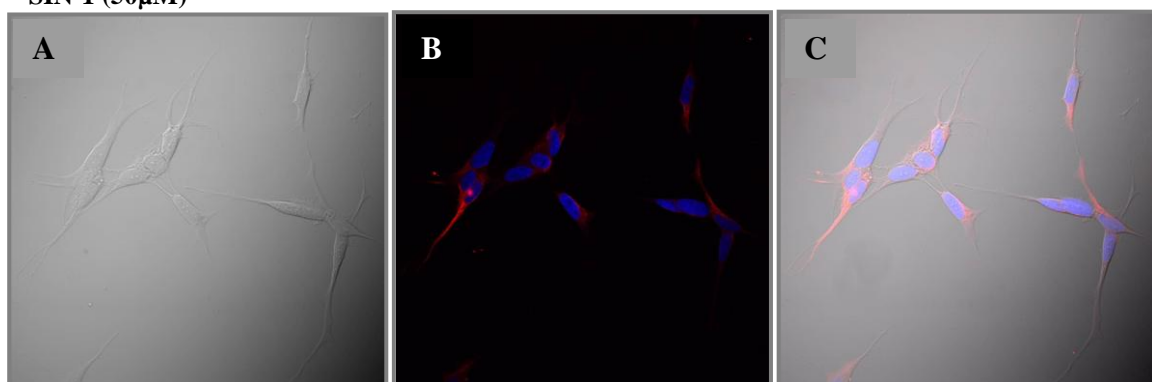
Encontra-se descrito em bibliografia que aumentos de tau diminuem o transporte axonal de neurofilamentos e de organelos como a mitocôndria, e consequentemente diminuição das neurites [4, 16, 21, 29, 36, 45]. Deste modo, foram feitos estudos de imunofluorescência para estudar a localização e distribuição da proteína tau e de neurofilamentos nas células SH-SY5Y. Para efectuar estes estudos os neuroblastomas humanos foram cultivados como nas restantes experiências, suplementando o meio de cultura com 10 $\mu$ M de ácido retinóico (AR) durante 3 dias antes da aplicação do tratamento com os doadores de NO. Assim, depois destes 3 dias de tratamento com ácido retinóico, as células encontravam-se já bem diferenciadas com longos prolongamentos permitindo-nos visualizar melhor a distribuição das proteínas de interesse. Para tal, as células foram tratadas por mais 24h com 50 e 100 $\mu$ M de DETA/NO e SIN-1 preparados em meio de cultura sem soro, ou apenas com meio de cultivo sem soro como controlo. De referir que nestas experiências se utilizaram concentrações de doadores de NO menores pelo facto de que a indução de diferenciação celular torna as células mais sensíveis, evitando deste modo uma taxa de morte celular elevada. No final deste tratamento as células foram marcadas com moléculas fluorescentes, tal como descrito em “Materiais e Métodos”, e as imagens desta marcação (Figuras 17 e 18) observadas com um aumento de 20X e/ou 40X no microscópio de fluorescência.

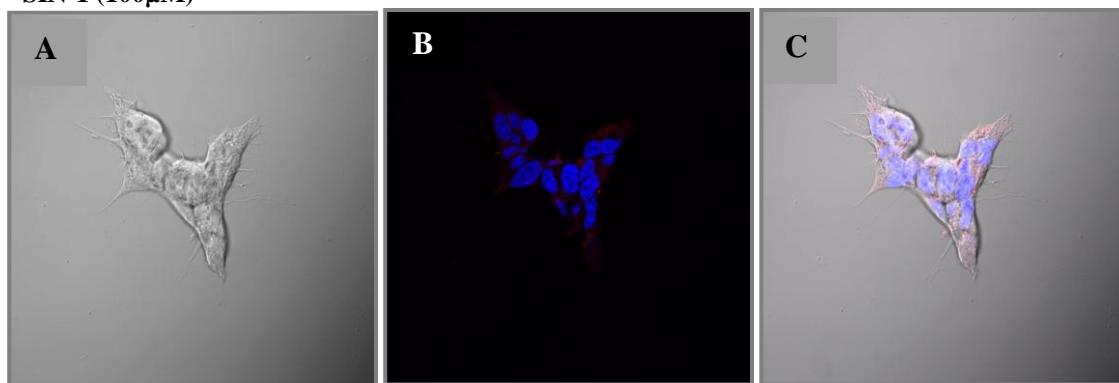


**Figura 17:** Localização da proteína tau nas células SH-SY5Y. As células foram incubadas durante três dias em meio DMEM/F-12 completo na presença de ácido retinóico. No quarto dia as células foram submetidas ao tratamento com as concentrações e doadores de NO indicados durante 24h após as quais as células foram fixadas e marcadas com anticorpo de tau. Nas imagens visualizam-se as marcações com tau (A), do núcleo (B) e a sobreposição de ambas as marcações (C).

Como se pode ver na figura 17, relativa às marcações com Ac de tau, nos controlos verifica-se que a proteína tau se encontra distribuída por todas as partes da célula, bem como acontece aquando do tratamento os neuroblastomas com 50 $\mu$ M de DETA/NO. No entanto, tratando as células com 100 $\mu$ M, quer de DETA/NO quer de

SIN-1 o que se observa é semelhante, isto é, com ambos os doadores a esta concentração há um retraimento das neurites bastante acentuado e visualiza-se que a proteínas tau se concentra essencialmente no espaço citoplasmático, com uma acumulação bastante considerável.

**Controlo****DETA/NO (50 $\mu$ M)****DETA/NO (100 $\mu$ M)****SIN-1 (50 $\mu$ M)**

**SIN-1 (100 $\mu$ M)**

**Figura 18:** Localização de neurofilamentos nas células SH-SY5Y. As células foram incubadas durante três dias em meio DMEM/F-12 completo na presença de ácido retinóico. No quarto dia as células foram submetidas ao tratamento com as concentrações e doadores de NO indicados durante 24h após as quais as células foram fixadas e marcadas com anticorpo de neurofilamentos. Nas imagens visualizam-se as células por contraste de fase (A), da marcação de neurofilamentos e núcleos celulares (B) e a sobreposição de A e B (C).

Na figura 18, relativa à marcação dos neurofilamentos, pode visualizar-se que a distribuição de neurofilamentos nas células se assemelha à distribuição da proteína tau (Figura 17). Ou seja, no que respeita à localização de neurofilamentos nas células controlo, esta encontra-se de igual modo distribuída uniformemente por toda a célula. Também o que se observa nos tratamentos com 50 $\mu$ M dos doadores de NO é similar, mas é já possível observar uma presença de neurofilamentos mais demarcada no corpo citoplasmático começando já a desaparecer nas neurites, essencialmente quando aplicado SIN-1. Aquando do tratamento com 100 $\mu$ M de doador, igualmente se visualiza um retraimento significativo dos prolongamentos axonais, encontrando-se os neurofilamentos acumulados no corpo celular ao redor dos núcleos. Além disso, é também evidente que a célula apresenta já uma morfologia apoptótica.

## *V – Discussão e conclusões*

Sabe-se que o NO se encontra envolvido em várias doenças neurológicas e têm surgido dados que mostram que o NO pode estar relacionado com muitos dos mecanismos patológicos da DA [30]. Uma das características da DA é a presença de numerosos NFTs [26] que são redes de filamentos compostas principalmente por proteína tau [51]. Neste trabalho utilizaram-se neuroblastomas humanos para investigar o efeito que alguns doadores de NO provocam na proteína tau.

Em primeiro lugar, confirmou-se a libertação de NO pelos doadores utilizados neste trabalho, DEANO, DETA/NO e SIN-1, pela sua medição indirecta através da medição de nitritos. Estes resultados encontram-se discriminados nas figuras 8 e 9, comprovando-se a libertação de NO. O DEANO é um doador de NO rápido com um tempo de meia-vida 2 minutos a 37°C. Por outro lado o DETA/NO está descrito como um doador de NO lento [54], com um tempo de meia-vida de 20 horas a 37°C [39]. O SIN-1, embora seja referido como um doador de NO, origina em quantidades equimolares NO e superóxido, produzindo assim peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) [39]. Na figura 9, relativa à evolução no tempo da formação de nitritos, no caso do DEANO presencia-se de imediato a maior concentração de NO libertado/250µM de doador comparativamente aos outros doadores; o que faz todo o sentido pois trata-se de um libertador rápido e atinge instantaneamente uma elevada concentração de NO libertada. Quanto ao DETA/NO e SIN-1 esperava-se visualizar uma libertação mais gradual, já que se trata de doadores de libertação lenta, e não de uma libertação com o mesmo padrão do DEANO.

Aquando o tratamento dos neuroblastomas humanos com os doadores de NO detectou-se um aumento dos níveis de tau, sobretudo nos tratamentos com DETA/NO e SIN-1, particularmente nas concentrações de 100 e 250µM de doador, seguido de uma acentuada diminuição. Pelo contrário no caso do DEANO visualiza-se um decréscimo da proteína em estudo. De notar que em qualquer doador há uma diminuição bastante mais acentuada quando se passa a tratamentos com concentrações elevadas, ou seja, com os tratamentos de 500 e 1000µM de doador. Na realidade, tem-se referido um papel duplo do NO, com acções benéficas ou citotóxicas, dependendo da sua concentração e do ambiente em que a célula se encontra. Enquanto quantidades pequenas de NO desempenham funções benéficas como por exemplo baixar a pressão sanguínea, quantidades excessivas, ou a sua combinação com radicais livres de oxigénio originam efeitos prejudiciais como morte celular associada à isquémia ou com algum processo inflamatório ou degenerativo [19]. Assim, a avaliar por estes resultados pode

confirmar-se que existe uma diferença de efeito de modo dependente das concentrações de doador usado no tratamento.

Ao compararem-se estes resultados com a viabilidade celular medida (Figura 13), verifica-se que nas concentrações em que ocorre um aumento de tau a viabilidade celular não sofre alterações significativas relativamente ao controlo. No entanto, nas concentrações mais elevadas além de se observar uma diminuição acentuada de tau também se visualiza um decréscimo significativo da viabilidade celular.

No que respeita aos resultados da análise da proteína tau com um tratamento dependente do tempo, o que se observou foram respostas distintas dependendo do doador de NO aplicado. No tratamento das células SH-SY5Y com DEANO observa-se que a quantidade de proteína tau vai aumentando gradualmente até às 6h, inclusive, diminuindo em seguida ligeiramente até às 24h. O aumento regista-se logo aos 15 minutos de tratamento, coincidindo com o tempo em que se atinge o primeiro pico de libertação de NO (Figura 9). Além disso, o aumento gradual de proteína tau observado está igualmente de acordo com a libertação de NO, que, depois dos 15 minutos, se vai libertando também gradualmente atingindo um novo pico às 6h onde há também um máximo de proteína detectado. Após esse pico detectado às 6h, a quantidade de tau detectada nas horas posteriores, isto é, 12 e 24h, sofre um ligeiro decréscimo que novamente coincide com a diminuição e NO libertado por este doador (Figura 9). Em relação ao DETA/NO (Figura 10) começa por ocorrer uma diminuição da proteína em estudo logo aos 15 minutos de tratamento com este doador, mas depois disso aumenta ligeiramente de um modo gradual, levando a crer que este aumento ocorre proporcionalmente à concentração de NO libertado pois, como referido anteriormente, o DETA/NO é um libertador lento. O efeito do SIN-1 na proteína tau ao longo do tempo não é muito variável à excepção das 24h onde se vê uma diminuição. Deste modo, não se encontra em concordância com o que se observou nas experiências de dose-resposta (Figura 10), realizadas a 24h, onde o nível de tau se encontra aumentado comparando com o controlo aquando do tratamento com 250µM de SIN-1. Esta diminuição pode dever-se a um erro de procedimento, tendo sido o poço relativo à amostra de 24h carregado com uma quantidade de proteína menor, como se pode comprovar pela imagem da actina apresentada (Figura 11). Também neste caso o nível de proteína tau detectado está em concordância com a quantidade de NO libertada por este doador, indicada na figura 9, apoiando que o nível de proteína tau é dependente da concentração de NO. Assim, de um modo geral, verificou-se que apenas o DETA/NO interfere na

quantidade de proteína tau de um modo dependente do tempo, sendo que os outros doadores não se registam variações significativas.

Analisando os resultados da morfologia e viabilidade celular verifica-se que os efeitos mais apreciáveis são provocados pelo SIN-1. Relembrando, este doador de NO liberta em quantidades equimolares NO e peroxinitritos pelo que se pode concluir que os resultados observados são o resultado dos danos provocados pelo NO e adicionalmente pelo anião  $\text{ONOO}^-$  ao qual se tem atribuído os efeitos prejudiciais na neurodegeneração por vários autores [40, 47, 56]. Deste modo, confirma-se mais uma vez que a actuação dos peroxinitritos é mais potente, exercendo mais e maiores efeitos deletérios que o NO isolado, ao contrário do que está descrito por Meij *et al.* [39]. Ou seja, dado que este doador apresenta efeitos mais acentuados que os restantes, DEANO e DETA/NO, pode-se atribuir este acréscimo de danos aos peroxinitritos libertados pelo SIN-1. Além disso, esta perda de viabilidade tão acentuada poderá também dever-se a uma quebra de ATP na célula, pois segundo Meij *et al.* o SIN-1 provoca uma queda rápida e transitória do ATP celular mesmo antes de um decréscimo abrupto da viabilidade celular sem um aumento significativo da actividade da caspase-3 ou degradação de DNA [39]. Embora de um modo ligeiramente menos acentuado, também com o DETA/NO se constatou uma diminuição de células viáveis quando em concentrações elevadas, principalmente quando aplicada uma concentração de 1mM. Também Meij *et al.* demonstrou que, no tratamento da mesma linha celular utilizada neste trabalho, aplicando 1mM de DETA/NO durante 24h a actividade da caspase-3 estava aumentada relativamente ao controlo, bem como foi visualizado uma fragmentação de DNA [39], pelo que neste caso a baixa viabilidade celular registada dever-se-á possivelmente a um aumento da actividade da caspase-3 e/ou a uma fragmentação de DNA.

Normalmente, quando se detecta um aumento da quantidade de uma proteína pode ser devido a um aumento de expressão a nível da transcrição, tradução ou devido a uma diminuição da sua degradação. Deste modo, estudou-se a causa deste aumento começando por analisar o mRNA da proteína tau por *Northern blot* que é uma técnica cujo principal objectivo é medir um mRNA específico [49]. Contudo, e apesar de se confirmar a presença de RNA por separação electroforética (Figura 14), a sua detecção por *Northern blot* não foi bem sucedida não tendo sido possível a detecção final do mRNA da proteína. Este resultado pode ter-se devido a um qualquer erro durante o



processo pois esta é uma técnica demasiado sensível pela dificuldade que existe em trabalhar com o RNA.

Não tendo sido possível a obtenção deste resultado, recorreu-se então ao uso de químicos interferentes nos mecanismos de tradução ou de transcrição, isto é, cicloheximida (CHX) e actinomicina D (Act D) respectivamente, tratando os neuroblastomas com estes adicionalmente aos doadores de NO. A cicloheximida é um antibiótico produzido pela *Streptomyces griseus* e mostrou ser um inibidor de síntese proteica tanto em leveduras como em células eucariotas. Baliga *et al.* [2] demonstraram que a cadeia de alongamento é inibida por diferentes concentrações de cicloheximida, [2]. Este químico bloqueia a fase de elongação da tradução eucariota ligando-se ao local E da subunidade ribossomal grande (60S), bloqueando a translocação do tRNA mediada por eEF2 do local A para o local P e, deste modo, reduz a taxa de formação de tripéptidos [42]. A actinomicina D é um antibiótico natural que inibe a transcrição de genes [28]. Por outro lado, a actinomicina D induz citotoxicidade através da intercalação do seu anel de fenoxazona no sulco menor do DNA, bloqueando assim a ligação da RNA polimerase II e subsequentemente inibindo a síntese de RNA [10]. Para além da sua ligação ao DNA na zona rica em GC, a actinomicina D tem sido referida por ter uma actividade de ligação ao DNA quando não se encontra em dupla hélice, como ao DNA em cadeia simples ou à estrutura *hairpin* [28].

Verifica-se pela figura 15 que o aumento de tau detectado anteriormente não ocorre por mecanismos de tradução quer com DETA/NO ou com SIN-1 pois não são visíveis diferenças significativas na presença ou ausência de cicloheximida. Caso se deve-se a mecanismos de tradução o que se deveria verificar nos tratamentos com o doador de NO e cicloheximida em simultâneo seria uma banda da proteína tau semelhante à que aparece apenas com o doador mas com alguma diminuição que seria causada pela aplicação do inibidor, o que não se observa, logo o efeito exercido pelo NO na proteína tau não se deve a fenómenos de alteração da tradução. Na figura 16 está claramente denotado que o tratamento dos neuroblastomas com a actinomicina D, em conjunto ou não com os doadores de NO, o efeito sobre a proteína tau é muito semelhante, como de facto se pode observar nos gráficos das densitometrias onde se observam densidades da banda iguais. Observando que os valores dos tratamentos, doador de NO e inibidor e apenas com inibidor, são muito próximos parece que o efeito da actinomicina D sobrepõe o do doador de NO, quer do DETA/NO quer do SIN-1. Deste modo, é susceptível de dúvida se o NO interfere nos mecanismos de transcrição

da tau, pelo que futuramente serão necessários mais estudos para o verificar. Curioso é o facto de que os níveis de tau em qualquer um dos tratamentos com os inibidores se encontram aumentados relativamente ao controlo, mais visivelmente na figura 16 com a actinomicina D. O que seria de esperar era que com o uso de inibidores, nomeadamente no tratamento das células com apenas estes, era uma quantidade de proteína tau igual ou menor do que nos controlos. No entanto, isto não foi o registado o que se pode explicar exactamente pelo facto de estarem a ser utilizados inibidores de síntese proteica. Isto é, os inibidores têm uma actuação geral, actuando não só na proteína tau mas também nas restantes proteínas celulares, entre elas as proteínas responsáveis pela eliminação de tau. Assim, como também está inibida a síntese destas proteínas a proteína tau ficará acumulada estando aumentada comparativamente aos controlos.

Ainda para confirmar que este aumento não se deve a mecanismos de expressão da proteína tau, nomeadamente a nível transcricional, realizaram-se experiências transfectando as células SH-SY5Y com o vector de expressão de tau pCMV5-htau40, pois uma vez que este não está sob o mesmo controlo do promotor da tau nativa e carece dos elementos de regulação transcricional do mRNA da tau também confirmaria se o aumento de proteína tau é, ou não devido a mecanismos de transcrição ou de tradução. Contudo, esta experiência revelou-se sem sucesso pois o método usado para a transfecção induzia a morte das células, impedindo assim que se pudesse prosseguir com a experiência. Por outro lado, pela escassez de tempo não se pôde concluir esta análise, pelo que futuramente se voltará a tentar realizar estas experiências.

Também um estudo anterior, no qual se injectou na amígdala de ratinhos  $\beta A_{1-42}$  e o seu fragmento  $\beta A_{25-35}$ , tinha já demonstrado níveis de proteína tau aumentados sem que este aumento estivesse associado aos níveis de expressão do seu mRNA. Estes dados sugeriram que este aumento dos níveis de tau pode ser devido à diminuição do *turnover* de proteínas em vez da expressão da proteína tau [11]. Logo, os resultados obtidos no trabalho desta tese levam a crer que também aqui o aumento de proteína tau se deva à alteração da sua degradação, não estando relacionada com a sua expressão. Além disso está descrito que os peroxinitritos são capazes de nitrificar e oxidar proteínas e que a nitrificação pode afectar muito o *folding* e função das proteínas [21] o que é possível que tenha ocorrido à proteína tau neste estudo com tratamentos de doadores de NO, particularmente com o SIN-1.

Na verdade, vários grupos têm referido recentemente uma associação entre a proteína tau e os *chaperones*. Estas proteínas, incluindo a família das proteínas de

choque térmico (Hsp – *Heat shock proteins*), são cruciais para a manutenção e *folding* apropriado de várias proteínas celulares [14,18]. Um membro importante desta família de proteínas é a Hsp70/Hsc70. A Hsp70 e a Hsc70 têm uma estrutura e função idêntica mas a Hsp70 é induzida por choque térmico enquanto a Hsc70 é constitutivamente expressa [18]. Dou *et al.* [15] foram os primeiros a demonstrarem que a Hsp70 e a Hsp90 se podem associar com a proteína tau [15]. A BAG-1 (*Bcl2-associated athanogene-1*), uma proteína adicional que liga Hsc70/Hsp70, foi recentemente implicada como uma molécula importante no desenvolvimento e manutenção dos neurónios [18, 23]. Elliott *et al.* [18] demonstrou que existe uma interacção entre a BAG-1 e a proteína tau dependente de Hsc70 e também que a BAG-1 tem a função de inibir a degradação da proteína tau através de uma via independente de ubiquitina, envolvendo o proteossoma 20S, levando a uma acumulação desta. Além disso, a Hsc70 por si só induz uma pequena inibição da degradação da tau pelo proteossoma 20S. Assim, a indução de Hsp70 aumenta a acumulação da proteína tau. Pelo que, de acordo com este modelo, a Hsc70 pode modular a degradação da tau recrutando a BAG-1 [18].

Outro estudo de Elliott *et al.* [17] constatou um aumento da BAG-1 na DA, encontrando-se esta co-localizada e fisicamente associada com a proteína tau intracelular e com o  $\beta$ A. Sabe-se ainda que a expressão de proteínas de choque térmico está relacionada com a  $\beta$ -APP [8] e que o NO está associado à activação e acumulação da Hsp70 [34, 37], sendo esta acumulação uma via comum através da qual os tecidos neutralizam os efeitos de ROS e RNS [9, 35]. Assim, pode acontecer que neste caso haja indução do *chaperone* Hsp70 e possivelmente da BAG-1, resultando então no aumento de proteína tau detectado com este trabalho.

Como referido nos resultados, encontra-se documentado que aumentos de tau diminuem o transporte axonal de neurofilamentos bem como outros de outros organelos como a mitocôndria, e consequentemente diminuição das neurites [4, 16, 21, 29, 36, 46]. Por isso, foi estudar-se a localização e distribuição da proteína tau e de neurofilamentos nas células de trabalho. Como descrito antes, estas foram tratadas com ácido retinóico previamente às experiências, isto porque quando adicionado a células já neuronais o ácido retinóico aumenta o número de neurites que se prolongam nas placas de cultura e aumenta o comprimento das mesmas [38]. Está descrito que o ácido retinóico é essencial para o crescimento embrionário e adulto, sendo originado a partir do retinol (vitamina A), sendo ainda capaz de induzir células indiferenciadas a diferenciarem-se em neurónios e glia [38]. Uma vez bem diferenciadas, as células foram

então sujeitas ao tratamento com 50 e 100 $\mu$ M os doadores de NO, DEATA/NO e SIN-1 e procedeu-se à detecção de proteínas por imunofluorescência de acordo com o descrito em “Materiais e Métodos”. Como referido nos “Resutados”, nestas experiências as concentrações de doadores utilizadas foram menores que as aplicadas anteriormente pelo facto de que a indução de diferenciação celular torna as células mais sensíveis, e também porque esta técnica exige uma manipulação exaustiva das células, estando estas portanto mais susceptíveis a tornarem-se não viáveis. De facto, o que se visualiza nas figuras 17 e 18 é que, a uma concentração de 100 $\mu$ M de doador de NO, há um retraimento bastante denotado das neurites, o que não se verificava nas experiências anteriores como se pode comprovar comparando com a morfologia apresentada na figura 12, quer no caso do DETA/NO (2.C) quer no caso do SIN-1 (3.C). Além da diminuição de dendrites e axónios verifica-se que a proteína tau e os neurofilamentos se acumulam no citoplasma.

Ebner *et al.* [16] demonstraram que a sobre-expressão da tau leva a uma mudança da morfologia celular, perda da polarização e retardamento do crescimento celular. Estes autores investigaram como um aumento do nível de proteína tau (originada por sobre-expressão ou micro-injecção) afecta o transporte intracelular nos neuroblastomas, tendo observado que aumentos de tau levam à acumulação de mitocôndrias e peroxissomas perto do centro organizador de microtúbulos (MTOC - *microtubule organizing center*), à contracção do sistema de filamentos intermédios e a uma taxa reduzida de exocitose. Observaram ainda que as células perdem a sua forma alongada e se tornam arredondadas, e a sua taxa de crescimento diminui [16]. Como o transporte mitocondrial diminui, em consequências também diminuem os níveis de ATP [21] o que por sua vez impede o crescimento celular. Também Stamer *et al.* observaram que na presença de um nível elevado de tau, as neurites se encontram reduzidas, e os neurofilamentos e mitocôndrias, que normalmente se encontram nas neurites, se aglomeram em redor do MTOC e do aparato de Golgi onde se originam os microtúbulos [46]. Tendo em conta que ao tratar as células com 100 $\mu$ M de DETA/NO e SIN-1 se observou um aumento do nível de tau (Figura 10, B e C) e que nas imagens obtidas por imunofluorescência (Figuras 17 e 18) aquando o tratamento com 100 $\mu$ M de doadores se visualiza uma diminuição de neurites com um acúmulo de tau e neurofilamentos no espaço citoplasmático, poderia mais uma vez confirmar-se o que está descrito por Ebner *et al.* [16] e Stamer *et al.* [46]. No entanto, isto não pode ser afirmado, pois por outro lado, a diminuição de prolongamentos celulares e consequente morte também

pode ser um efeito independente do aumento de tau, mas sim da actuação do NO e peroxinitritos. Ou seja, a acumulação de neurofilamentos, a diminuição de neurites e consequente arredondamento das células denotando a sua entrada em apoptose, pode ser provocado via activação de caspase-3 e/ou perda de ATP como referido anteriormente; ou por outro lado desencadeadas pelo aumento de proteína tau detectado. Na verdade, sabe-se que o aumento de tau pode, não só prejudicar a neurotransmissão normal, mas também tornar os neurónios mais susceptíveis ao stress relacionado com a idade [21] e ainda a queda das defesas contra o stress oxidativo [36], pelo que os resultados observados nas figuras 17 e 18 podem ser a resultado da actuação conjunta do efeito dos doadores de NO com o nível de proteína tau aumentado. Deste modo, em trabalhos futuros seria interessante estudar qual a via que leva à diminuição dos prolongamentos e da acumulação de proteínas no citoplasma.

Como antes indicado, uma das consequências mais visíveis com o aumento de proteína tau é a alteração drástica da distribuição da mitocôndria, passando a aglomeram-se perto do MTOC [16, 36, 46]. Como tal, tentou observar-se a sua distribuição neste trabalho, no entanto não foi possível visualizar estes resultados pelo que também se irá estudar futuramente a distribuição de mitocôndrias nestas células, bem como de peroxissomas.

Em conclusão, neste trabalho de investigação detectou-se que os doadores de NO levam a uma aumento de tau quando aplicado em baixas concentrações. Contudo, com o tratamento com elevadas concentrações de doadores de NO o nível de tau diminui acentuadamente, bem como diminui a viabilidade celular e os prolongamentos neuronais. Estudando este aumento de proteína tau, conclui-se que não está relacionado com mecanismos de expressão, quer a nível de transcrição ou de tradução, mas sim associado provavelmente a um impedimento da sua degradação, colocando a hipótese que o *chaperone* Hsp70 esteja a ser induzido, possivelmente via BAG-1. Paralelamente a estes resultados, observou-se, recorrendo à imunofluorescência, que a proteína tau e os neurofilamentos se acumulam no citoplasma, havendo também perda de dendrites e axónios, quando tratadas com a concentração de doadores de NO em que se detecta um maior nível de tau. Contudo, não se pode para já afirmar que estes resultados são a consequência do aumento do nível de tau, do efeito do NO ou de ambos, pelo que será necessário realizar mais estudos para melhor compreender os efeitos do NO e peroxinitritos na proteína tau.

## *VI - Bibliografia*

1. ALIEV G., PALACIOS H.H., LIPSITT A.E., FISCHBACH K., LAMB B.T., OBRENOVICH M.E., MORALES L., GASIMOV E., BRAGIN V., (2009). "Nitric Oxide as an Initiator of Brain Lesions During the Development of Alzheimer Disease." *Neurotoxicity Research*, **Vol.16**: 293-305.
2. BALIGA B.S., PRONCZUK A.W., MUNRO H.N., (1969) "Mechanism of Cycloheximide Inhibition of Protein Synthesis in a Cell-free System Prepared from Rat Liver." *The Journal of Biological Chemistry*, **Vol.244**: 4480-4489.
3. BRADFORD, M.M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry*, **Vol.72**: 248-54.
4. BRANDT R., HUNDELT M., SHAHANI N. (2005) "Tau Alteration and Neuronal Degeneration in Tauopathies: Mechanisms and Models." *Biochimica Et Biophysica Acta*, **Vol.1739**: 331-354.
5. BUÉE L., BUSSIÈRE T., BUÉE-SCHERRER V., DELACOURTE V., (2000). "Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders." *Brain Research Reviews*, **Vol.33**: 95-130.
6. BURNETTE, W.N., (1981). "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A." *Analytical Biochemistry*, **Vol.112**: 195-203.
7. BUTTERFIELD D.A., PERLUIGI M., R. SULTANA., (2006). "Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain: New Insights." *European Journal of Pharmacology*, **Vol.545**: 39-50.
8. CALABRESE V., BOYD-KIMBALL D., SCAPAGNINI G., BUTTERFIELD D.A., (2004) "Nitric Oxide and Cellular Stress Response in Brain Ageing and Neurodegenerative Disorders: The Role of Vitagenes." *In Vivo Journal*, **Vol.18**: 245-268.
9. CALABRESE V., MANCUSO C., RAVAGNA A., PERLUIGI M., CINI C., DE MARCO C., BUTTERFIELD D.A., AND STELLA A.M.G., (2007) "In

- Vivo Induction of Heat Shock Proteins in the Substantia Nigra following L-DOPA Administration Is Associated with Increased Activity of Mitochondrial Complex I and Nitrosative Stress in Rats: Regulation by Glutathione Redox State." *Journal of Neurochemistry*, **Vol.101**: 709-717.
10. CERVANTES-GOMEZ F., NIMMANAPALLI R., GANDHI V., (2009) "Transcription Inhibition of Heat Shock Proteins: A Strategy for Combination of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin and Actinomycin D." *Cancer Research*, **Vol.69**: 3947-3954.
  11. CHAMBERS C.B., SIGURDSSON E.M., HEJNA M.J., LORENS S.A., LEE J.M., MUMA N.A., (2000) "Amyloid- $\beta$  Injection in Rat Amygdala Alters Tau Protein but Not mRNA Expression." *Experimental Neurology*, **Vol.162**: 158-170.
  12. CONTESTABILE A., CIANI E., (2004). "Role of Nitric Oxide in the Regulation of Neuronal Proliferation, Survival and Differentiation." *Neurochemistry International*, **Vol.45**: 903-914.
  13. CONTESTABILE, A., (2008). "Regulation of Transcription Factors by Nitric Oxide in Neurons and in Neural-derived Tumor Cells." *Progress in Neurobiology*, **Vol.84**: 317-328.
  14. DICKEY C.A., KAMAL A., LUNDGREN K., KLOSAK N., BAILEY R.M., DUNMORE J., ASH P., SHORAKA S., ZLATKOVIC J., ECKMAN C.B., PATTERSON C., DICKSON D.W., NAHMAN JR. N.S., HUTTON M., BURROWS F., PETRUCCELLI L., (2007) "The High-affinity Hsp90-CHIP Complex Recognizes and Selectively Degrades Phosphorylated Tau Client Proteins." *The Journal of Clinical Investigation*, **Vol.117**: 648-658.
  15. DOU F., NETZER W.J., TANEMURA K., LI F., HARTL F.U., TAKASHIMA A., GOURAS G.K., GREENGARD P., XU H., (2003) "Chaperones Increase Association of Tau Protein Chaperones Increase Association of Tau Protein." *Proceedings of the National Academy of Science Journal*, **Vol.100**: 721-726.
  16. EBNETH A., GODEMANN R., STAMER K., ILLENBERGER S., TRINCZEK B., MANDELKOW E.-M., MANDELKOW E., (1998) "Overexpression of Tau



- Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease." *The Journal of Cell Biology*, **Vol.43**: 777-794.
17. ELLIOTT E., LAUFER O., GINZBURG I., (2009) "BAG-1M is Up-regulated in Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients and Associates with Tau and APP Proteins." *Journal of Neurochemistry*, **Vol.109**: 1168-1178.
18. ELLIOTT E., TSVETKOV P., GINZBURG I., (2007) "BAG-1 Associates with Hsc70Tau Complex and Regulates the Proteasomal Degradation of Tau Protein." *The Journal of Biological Chemistry*, **Vol.282**: 37276-37284.
19. ESTRADA C., MURILLO-CARRETERO M., (2005). "Nitric Oxide and Adult Neurogenesis in Health and Disease." *The Neuroscientist*, **Vol.11**: 294-307.  
<<http://nro.sagepub.com/cgi/content/abstract/11/4/294>>.
20. FORMICHI P., BATTISTI C., RAD E., FEDERICO A., (2006). "Cerebrospinal Fluid Tau, A $\beta$ , and Phosphorylated Tau Protein for the Diagnosis of Alzheimer's Disease." *Journal of Cellular Physiology*, **Vol.208**: 39-46.
21. GENDRON T.F., PETRUCCELLI L., (2009). "The Role of Tau in Neurodegeneration." *Molecular Neurodegeneration*, **Vol.4**.  
<<http://www.molecularneurodegeneration.com/content/4/1/13>>.
22. GONG C.-X., IQBAL K., (2008). "Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease." *Current Medicinal Chemistry*, **Vol.15**: 2321-2328.
23. GÖTZ R., WIESE S., TAKAYAMA S., CAMARERO G.C., ROSSOLL W., SCHWEIZER U., TROPPEMAIR J., JABLONKA S., HOLTMANN B., REED J.C., RAPP U. R., SENDTNER M., (2005) "Essential Role of Bag-1 in Differentiation and Survival of Hematopoietic and Neuronal Cells." *Nature Neuroscience*, **Vol.8**: 1169-1178.
24. HARA M R., SNYDER S.H., (2007). "Cell Signaling and Neuronal Death." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **Vol.47**: 117-141.

25. IQBAL K., GRUNDKE-IQBAL I., (2005). "Metabolic/signal Transduction Hypothesis of Alzheimer's Disease and Other Tauopathies." *Acta Neuropathologica*, **Vol.109**: 25-31.
26. IQBAL K., GRUNDKE-IQBAL I., (2008). "Alzheimer Neurofibrillary Degeneration: Significance, Etiopathogenesis, Therapeutics and Prevention." *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **Vol.12**; No.1: 38-55.
27. IRVINE G.B., EL-AGNAF O.M., SHANKAR G.M., WALSH D.M., (2008). "Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Disease." *Molecular Medicine*, **Vol.14**: 451-64.
28. KANG H. J., PARK H.J., (2009)"Novel Molecular Mechanism for Actinomycin D Activity as an Oncogenic Promoter G-Quadruplex Binder." *Biochemistry*, **Vol.48**: 7392-7398.
29. KAR A., KUO D., HE R., ZHOU J., WU J.Y., (2005). "Tau Alternative Splicing and Frontotemporal Dementia." *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, **Vol.19**: 29-36.
30. LAW A., GAUTHIER S., QUIRION R., (2001). "Say NO to Alzheimer's Disease: the Putative Links between Nitric Oxide and Dementia of the Alzheimer's Type." *Brain Research Reviews*, **Vol.35**: 73-96.
31. LEONELLI M., TORRÃO A.S., BRITTO L.R.G., (2009). "Unconventional Neurotransmitters, Neurodegeneration and Neuroprotection." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **Vol.42**: 68-75.
32. LODISH, H., J. DARNELL, AND D. BALTIMORE. *Molecular Cell Biology*. 5<sup>th</sup> Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2004.
33. MACCIONI R.B., MUÑOZ J.P., BARBEITO L., (2001). "The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders." *Archives of Medical Research*, **Vol.32**: 367-81.
34. MALYSHEV I.Y., MANUKHINA E.B., MIKOYAN V.D., Kubrina L.N., Vanin A.F., (1995) "Nitric Oxide Is Involved in Heat-induced Hsp70

- Accumulation." *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **Vol.370**: 159-162.
35. MANCUSO C., SCAPAGNINI G., CURRÒ D., STELLA A.M.G., DE MARCO C., BUTTERFIELD D.A., CALABRESE V., (2007) "Mitochondrial Dysfunction, Free Radical Generation and Cellular Stress Response in Neurodegenerative Disorders." *Frontiers in Bioscience*, **Vol.12**: 1107-1123.
36. MANDELKOW E.-M., STAMER K., VOGEL R., THIES E., MANDELKOW E., (2003) "Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses." *Neurobiology of Aging*, **Vol.24**: 1079–1085.
37. MANUCHA W., VALLÉS P., (2008) "Hsp70/nitric Oxide Relationship in Apoptotic Modulation during Obstructive Nephropathy." *Cell Stress and Chaperones*, **Vol.13**: 413-420.
38. McCAFFERY P. J., ADAMS J., MADEN M., ROSA-MOLINAR E., (2003) "Too Much of a Good Thing: Retinoic Acid as an Endogenous Regulator of Neural Differentiation and Exogenous Teratogen." *European Journal of Neuroscience*, **Vol.18**: 457-472.
39. MEIJ J.T.A., HASELTON C.L., HILLMAN K.L., MURALIKRISHNAN D., EBADI M., YU L., (2004). "Differential Mechanisms of Nitric Oxide- and Peroxynitrite-Induced Cell Death." *Molecular Pharmacology*, **Vol.66**: 1043-1053.
40. PACHER, P., BECKMAN J.S., (2007) "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease." *Physiological Reviews*, **Vol.87**: 315-424.
41. QUERFURTH H.W., LAFERLA F.M., (2010). "Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine*, **Vol.362**: 329-344.
42. SCHNEIDER-POETSCH T., JU J., EYLER D. E., DANG Y., BHAT S., MERRICK W. C., GREEN R., SHEN B., LIU J.O., (2010) "Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin." *Nature Chemical Biology*, **Vol.6**: 209-217.

43. Sigma-Aldrich Catalogue. *Reactivos Bioquímicos Y Kits Para Investigación En Ciencias De La Vida*. Madrid: Sigma-Aldrich, 2007.
44. SIMONIAN M.H., SMITH J.A., (2006). "Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration." *Current Protocols in Molecular Biology*, **Vol.10.1A**: 1-9.  
<<http://www.currentprotocols.com/protocol/mb1001a>>.
45. SOBÓW T., FLIRSKI M., LIBERSKI P.P., (2004). "Amyloid-beta and Tau Proteins as Biochemical Markers of Alzheimer's Disease." *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **Vol.64**: 53-70.
46. STAMER K., VOGEL R., THIES E., MANDELKOW E., MANDELKOW E.-M., (2002) "Tau Blocks Traffic of Organelles, Neurofilaments, and APP Vesicles in Neurons and Enhances Oxidative Stress." *The Journal of Cell Biology*, **Vol.156**: 1051-1063.
47. TORREILLES F., SALMAN-TABCHEH S., GUÉRIN M.C., TORREILLES J., (1999) "Neurodegenerative Disorders: the Role of Peroxynitrite." *Brain Research Reviews*, **Vol.30**: 153-163.
48. TORREILLES F., TOUCHON J., (2002). "Pathogenic Theories and Intrathecal Analysis of the Sporadic Form of Alzheimer's Disease." *Progress in Neurobiology*, **Vol.66**: 191-203.
49. TRAYHURN, P., (1996). "Northern Blotting." *Proceedings of the Nutrition Society*, **Vol.55**: 583-89;
50. TSIKAS, D., (2007). "Analysis of Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Assays Based on the Griess Reaction: Appraisal of the Griess Reaction in the L-arginine/nitric Oxide Area of Research." *Journal of Chromatography B*, **Vol.851**: 51-70;
51. TUPPO E.E., ARIAS H.R., (2005). "The Role of Inflammation in Alzheimer's Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 289-305.

52. WEISMAN D., HAKIMIAN E., HO G.J., (2006). "Interleukins, Inflammation, and Mechanisms of Alzheimer's Disease." *Vitamins and Hormones*, **Vol.74**: 505-530.
53. WELSH-BOHMER K.A., WHITE C.L., (2009). "Alzheimer Disease: What Changes in the Brain Cause Dementia?" *Neurology*, **Vol.72**: E21-23.  
<<http://www.neurology.org/cgi/content/full/72/4/e21>>.
54. WILKINS A., COMPSTON A., (2005) "Trophic Factors Attenuate Nitric Oxide Mediated Neuronal and Axonal Injury in Vitro: Roles and Interactions of Mitogen-activated Protein Kinase Signalling Pathways." *Journal of Neurochemistry*, **Vol.92**: 1487-1496.
55. WOSTYN PAUDENAERT., K., DE DEYN P.P., (2008). "Alzheimer's Disease-related Changes in Diseases Characterized." *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **Vol.110**: 101-109.
56. XIE Z., WEI M., MORGAN T.E., FABRIZIO P., HAN D., FINCH C. E., LONGO V.D., (2002) "Peroxynitrite Mediates Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Peptide<sub>1-42</sub><sup>-</sup> and Lipopolysaccharide-Activated Microglia." *The Journal of Neuroscience*, Vol.22: 3484-3492.